

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



**VALORES ANALÍTICOS DE GANADO VACUNO EN  
RÉGIMEN EXTENSIVO EXPUESTO AL CONSUMO  
DE HELECHOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Francisco Javier Blanco Murcia

Bajo la dirección de la doctora  
Laura Peña Fernández

**Madrid, 2012**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

**VALORES ANALÍTICOS DE GANADO  
VACUNO EN RÉGIMEN EXTENSIVO  
EXPUESTO AL CONSUMO DE HELECHOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Francisco Javier Blanco Murcia**

**Madrid, 2011**



Prof. Dr. Laura Peña Fernandez, con D.N.I. 00806634R, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada "Valores analíticos de ganado vacuno en régimen extensivo expuesto al consumo de helechos", ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D. F.Co Javier Blanco Murcia.

Revisado el presente trabajo, considera que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

En Madrid, a 29 de noviembre de 2011

Prof. Dr. Laura Peña Fernandez



# ÍNDICE

Abreviaturas .....	1
Revisión bibliográfica .....	3
A. Hematuria enzoótica bovina .....	3
Concepto y etiopatogenia .....	3
Distribución y prevalencia de la HEB.....	4
Distribución y prevalencia de la HEB en España .....	6
B. Patologías asociadas al consumo de heleichos .....	8
Toxicidad por ingestión de heleicho.....	8
Modificaciones de la actividad carcinogénica del heleicho .....	11
Intoxicación en monogástricos por heleichos .....	14
Intoxicación aguda en rumiantes .....	15
Intoxicación crónica en rumiantes.....	16
C. Riesgos para la salud humana .....	18
Consumo de leche contaminada con PT .....	18
D. Alteraciones macroscópicas e histológicas .....	20
Histopatología, inmunohistoquímica y alteraciones moleculares de los tumores vesicales.....	21
HEB y papilomavirus bovino.....	25
E. Diagnóstico de la HEB .....	27
F. Terapia y control de los heleichos .....	30
G. HEB experimental.....	32
Bovino y ovino .....	32
Roedores.....	33
Otras especies .....	35
H. Monocitosis en el ganado vacuno .....	36
Hipótesis y Objetivos .....	41
Material y Métodos .....	43
A. Diseño del estudio .....	43
B. Descripción del ganado y su manejo.....	43
C. Animales y grupos de estudio.....	45
D. Historial .....	47
E. Examen físico .....	48
F. Toma de muestras.....	48

G. Pruebas analíticas.....	50
Hematología y bioquímica sanguínea .....	50
Urianálisis .....	52
H. Necropsia .....	52
I. Análisis estadísticos .....	53
Resultados .....	55
A. Historia y datos clínicos .....	55
Historial de hematuria .....	55
Conformación corporal .....	55
Exploración clínica .....	56
B. Patología clínica .....	56
C. Hematología y pruebas de coagulación .....	57
Serie roja .....	57
Leucocitos .....	57
Pruebas de coagulación .....	65
Perfil bioquímico .....	65
D. Urianálisis .....	68
Proteinuria .....	68
Microhematuria .....	68
Sedimento urinario .....	69
E. Estudio Multivariante: análisis estadísticos de variables múltiples. tipología.....	71
F. Hallazgos macroscópicos e histopatológicos.....	79
Discusión .....	83
A. Fases clínicas de la HEB.....	83
B. Monocitosis como marcador de enfermedad inicial.....	85
C. Otros hallazgos analíticos de interés.....	88
D. Importancia del diagnóstico de animales con HEB subclínica y su implicación en la sanidad humana y animal .....	92
E. Importancia del estudio en el contexto de la HEB en España .....	97
F. Originalidad, fiabilidad y posibles mejoras del estudio .....	99
CONCLUSIONES .....	101
<b>RESUMEN</b> .....	103
Summary .....	105
Bibliografía .....	107

## AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, quisiera comenzar agradeciendo de manera muy especial todo el apoyo y dedicación recibidos de mi directora, la Profesora Doctora Laura Peña Fernández. y su inagotable paciencia.

A todos los profesores del departamento de Medicina y Cirugía de la Universidad Complutense de Madrid y en especial a Rosa Ana García Fernández y a David Sardón por iniciar el camino y darme apoyo tanto académico como personal

Al Doctor Pedro Cuesta, por su disponibilidad y su rigurosidad en el procesado estadístico de los datos.

A los propietarios de las explotaciones: Finca San Polo (Extremadura), Javier Hernández (Los Molinos) y Pió Hijosa (Guadarrama) por su disponibilidad, cooperación y trato recibidos.

A mi familiares y amigos en especial a Ignacio Álvarez por estar siempre dispuesto a ayudarme.

A mi mujer Michela. por tu cariño, paciencia, apoyo , ayuda y dedicación, por ser junto con mis hijos Sara y Pablo, lo mejor de mi vida.

Quisiera finalizar con un agradecimiento generalizado a todos los que, de una u otra forma han hecho posible la elaboración de esta Tesis Doctoral.





## **ABREVIATURAS**

---

ADN = Acido desoxirribonucleico

A/G Relación antígeno-anticuerpo

BPV = Papilomavirus bovino

BPV-1= Papilomavirus bovino tipo 1

BPV-2 = Papilomavirus bovino tipo 2

BPV-4 = Papilomavirus bovino tipo 4

CHCM = Concentración hemoglobina corpuscular media

DE = Desviación estándar

EDTA = ácido etilendiaminotetraacético

GGT = Gamma glutamil transpeptidasa

HCM = Hemoglobina corpuscular media

HEB = Hematuria Enzoótica Bovina

ISI = Institute for Scientific Information

JCR = Journal Citation Reports

PT = Ptaquilósido

PTA= Ptaquilósido (forma activada)

TNF- $\alpha$  = Factor de necrosis tumoral alpha

TP = Tiempo de protrombina

TTP = Tiempo de tromboplastina parcial

TTPA = Tiempo de tromboplastina parcial activado

VCM = Volumen corpuscular medio



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

### A. Hematuria enzoótica bovina

La Hematuria Enzoótica Bovina (HEB) es un síndrome caracterizado por hematuria persistente, anemia y hemorragias en el que se desarrollan lesiones hemangiomatosas y tumores de la vejiga de la orina (2007; Radostits y Done 2007; Van Metre 2009). La enfermedad se atribuye a la ingestión crónica de helechos (*Pteridium* spp.). Éstos constituyen una especie vegetal con una amplia distribución en todo el mundo, preferentemente en suelos ácidos y con buen drenaje, localizada comúnmente de forma natural en pastos de montaña, así como en suelos pobres deforestados o tras la desaparición de praderas naturales por sequía o sobreexplotación. El consumo de los helechos por parte de los animales se produce de forma natural, pero aumenta considerablemente de forma estacional por escasez de pastos. La HEB es una enfermedad conocida desde hace mucho tiempo y en algunas zonas del mundo es una enfermedad relevante bien porque causa pérdidas económicas cuantiosas o bien porque afecta directamente a la salud humana (Alonso-Amelot et al. 1996; Shahin et al. 1999; Alonso-Amelot y Avendaño 2001).

### Concepto y etiopatogenia

La enfermedad se origina por la ingestión crónica de helechos (*Pteridium* spp.) durante al menos un periodo de dos o tres años (Campo et al. 1994; Sánchez-Villalobos et al. 2006). El ganado vacuno en pastoreo se encuentra en contacto, de forma natural, con esta planta, pero sólo aumenta su ingestión en condicio-

nes desfavorables, como durante los períodos de sequía (especialmente en verano), cuando se produce sobre explotación de los pastos, o en caso de deterioro del bosque (Giurgiu *et al.* 2008).

Se considera que el principal tóxico responsable de esta patología es el ptaquilósido (PT), que induce la formación de los tumores vesicales al ser eliminado en orina (Hirono *et al.* 1987; Jones y Hunt 1997; Shahin *et al.* 1998). Además, se ha demostrado que existe una relación entre la HEB y la infección latente por papilomavirus bovino tipos 2 y 4, que desempeña un papel importante en el desarrollo de tumores en la vejiga (Campo *et al.* 1992). Del mismo modo se ha observado que una dieta rica en helechos origina una inmunosupresión en los animales, la cual exacerba los papilomas latentes (Campo y Jarrett 1986).

La HEB es, por tanto, una enfermedad neoplásica de origen nutricional debida a un manejo que permite el consumo de helechos, usualmente por una alimentación incorrecta de las explotaciones en régimen extensivo o semi-extensivo, pues se permite pastar a los animales en áreas donde crecen los helechos.

### **Distribución y prevalencia de la HEB**

La HEB es una enfermedad de amplia distribución mundial de carácter endémico (Giurgiu *et al.* 2008), incluyendo países como Estados Unidos de América (Smith *et al.* 1988; Villalobos-Salazar *et al.* 1989; Seifi *et al.* 1995), zonas de América central y América del sur, Asia central, sur de la India, China, Japón, Filipinas, Australia y Nueva Zelanda (Jones y Hunt 1997). Del mismo modo en Europa se ha descrito HEB en regiones donde abundan los helechos en zonas de pasto debido a una elevada humedad y a las características de sus suelos, como en Gran Bretaña (Escocia y Gales), Francia, Portugal (Azores), Rumanía, Federación

Yugoslava (Goto et al. 1954; Pamukcu et al. 1976; Jarrett et al. 1978; Villalobos-Salazar et al. 1989; Pinto et al. 2001). La prevalencia de la enfermedad es muy variable en virtud de la mayor o menor presencia del helechó en el área estudiada, así se observan prevalencias del 90% en Bulgaria (Pamukcu et al. 1976), 20-30% en Escocia (Jarrett et al. 1978; Taylor 1985), 9% en Irán (Seifi et al. 1995) mientras que en países donde no es frecuente la incidencia de helechos como en Kenia o Estados Unidos las frecuencias son inferiores al 0,1 y 0,01% respectivamente (Olson et al. 1965).

Por otra parte la incidencia de neoplasias vesicales en el ganado bovino, principal manifestación patológica de la HEB, se conoce a través de diversos estudios llevados a cabo sobre el total de tumores hallados en matadero durante un determinado periodo. Para la localización de lesiones tumorales en vejiga se requiere un seccionado rutinario de la misma, práctica poco habitual en mataderos. La incidencia varía entre el 0,01% de los tumores totales de Estados Unidos (Mugera y Nerito 1968) y el 0,7% en Canadá (Hamir y Parry 1980) donde el seccionado de vejiga no era habitual, al 6,2% encontrado en Australia al realizar un estudio en el que se inspeccionaron, previa sección, las vejigas de 2832 bovinos en dos mataderos durante un año (McKenzie 1978). La incidencia de estos tumores aumentó de manera considerable cuando los estudios se realizaron en mataderos donde se sacrificaban animales procedentes de zonas con elevada tasa de HEB clínica; así se observó una incidencia del 20% en las islas Azores de Portugal (Pinto et al. 1996), el 30% en Escocia, 80% en Formosa (Goto et al. 1954) o el 90% en Bulgaria (Pamukcu et al. 1976).

En principio no existe una predisposición según el género del animal, aunque sí que aparece más frecuentemente en hembras durante la gestación y después del parto, cuando las manifestaciones clínicas son más severas (Giurgiu et al. 2008).

## **Distribución y prevalencia de la HEB en España**

Hasta el momento actual, no se conoce que se hayan realizado estudio sobre la incidencia de la HEB o de los tumores vesicales descritos en la misma en España. No obstante, la presencia del helecho común es frecuente en el norte de la península y en zonas de monte del resto del país <sup>(Castroviejo *et al.* 1986)</sup>. En un estudio realizado sobre 126 vejigas urinarias de vacas procedentes de un matadero del norte de España se observaron cambios macroscópicos en un 36,5%, de los cuales el 34,1% presentaban cistitis crónica y el 2,4% tumores<sup>(Sardon *et al.* 2005)</sup>.

Este hecho hace pensar que el ganado bovino en explotación extensiva o semiextensiva tiene fácil acceso al consumo de helechos durante ciertos periodos del año, que se pueden producir en años consecutivos. Así, se conoce la existencia de la enfermedad en nuestro país gracias al intercambio de datos y participaciones en congresos y coloquios de especialización bovina que tienen lugar en la geografía española, así como por la experiencia personal del equipo investigador.

El ganado vacuno ingiere los helechos en épocas calurosas principalmente, al final del verano o comienzos del otoño, cuando los pastos carecen de hierba. En otras épocas del año suelen evitar su consumo. Uno de los factores que contribuyen al aumento en la ingestión de helechos es el cambio en la alimentación del ganado vacuno que se ha ido produciendo a lo largo de los últimos años. En el momento actual únicamente se suplementa a los animales en pastoreo con piensos compuestos prescindiendo de un aporte extra de forrajes, con lo cual los animales suplen sus necesidades de fibra, en épocas de escasez, con un aumento del consumo de helechos. Se ha observado que este hecho ha ido en aumento en los últimos 10 años.

El número de animales en régimen extensivo ha aumentado en España durante las últimas épocas ya que se ha dado prioridad a este tipo de cría, lo que ha provocado el aumento de animales que desarrollan HEB en nuestro país. Muchos de ellos pastan libremente en zonas en las que se dan con facilidad los helechos, que pasan a ser un alimento complementario cuando el pasto escasea. Del mismo modo, la deforestación provocada entre otras causas por los incendios y la sequía, son factores que favorecen el crecimiento de helechos frente a especies pratenses más adecuadas para el ganado. Dadas las condiciones climáticas y las relaciones con el medio ambiente en los últimos años en nuestro país, podemos suponer que las zonas con helechos están aumentando o van a hacerlo considerablemente, como ocurre en el resto del mundo y que, por tanto, la HEB puede verse convertirse en un proceso relevante y bastante frecuente.

En áreas donde existe un sistema de explotación extensivo tradicional, como es el caso de la zona de Plasencia, la HEB obedece a un sistema de explotación extensivo tradicional en el que también se utilizan los pastos de montaña como pastos de verano. En las zonas húmedas de España, como en otros países europeos, el problema podría deberse, sencillamente, a la abundancia de helechos (Castroviejo et al. 1986).



## B. Patologías asociadas al consumo de helechos

### Toxicidad por ingestión de helecho

El helecho (*Pteridium aquilinum*), que se encuentra entre las cinco plantas más comunes en el ámbito mundial, presenta una serie de compuestos tóxicos que han sido estudiados en múltiples investigaciones. Entre los tóxicos que contiene el helecho los hay con capacidad inflamatoria, así como con capacidad mutagénica y carcinogénica.

Se han descrito sustancias con capacidad inflamatoria, como los glucósidos, braxina A1 y braxina A2, que fueron aislados del rizoma del helecho (Saito y Mochizuki 1986). Éstos dan lugar a un proceso inflamatorio en ratas y a la liberación de histamina por parte de los mastocitos dosis-dependiente. Además, administrados en cobayas, son capaces de reproducir los efectos de una intoxicación aguda por helechos (Saito *et al.* 1987).

Pero también existen otras sustancias con mayor o menor actividad mutagénica y carcinógena. Algunos de estos compuestos han sido identificados como astragalina, isoquercetina (Nakabayashi 1955), ácido cafeico (Somogyi 1971) y ácido 5-O- cafeilshiquímico (Fukuoka 1982). Entre los tóxicos con capacidad mutagénica con alta presencia en el helecho se encuentra la quercetina (Nakayasu *et al.* 1986). Se trata de un flavonoide mutagénico que se une al ADN causando la rotura de las cadenas simples (Fazal *et al.* 1990), reagrupamientos (Suzuki *et al.* 1991) y daño cromosómico (Ishidate 1988) así como un bloqueo de las células en la fase G1 del ciclo celular (Connolly *et al.* 1998). Varios estudios han demostrado que una única dosis de quercetina puede provocar un crecimiento descontrolado e inducir la transformación oncogénica (Pennie y Campo 1992; Cairney y Campo 1995). Pa-

mukcu *et al.* <sup>(1980)</sup> destacaron que la concentraciones del 0,1% de quercetina en la dieta provocaba tumores intestinales (80%) y tumores vesicales (20%) en ratas, datos que no pudieron ser confirmados en sucesivos estudios <sup>(Saito *et al.* 1980; Hirono *et al.* 1981)</sup>, por lo cual se duda de su actividad como carcinógeno <sup>(Hirono 1992; Shahin *et al.* 1999)</sup>. Otras sustancias mutagénicas pero no carcinogénicas, aisladas en los helechos fueron el quenferol <sup>(Wang *et al.* 1973)</sup> o los taninos. En el caso de los últimos, se demostró su capacidad de ocasionar tumores de vejiga mediante la inoculación sanguínea en ratones <sup>(Wang *et al.* 1976)</sup> aunque carecían de ella cuando se administraban en la dieta <sup>(Pamukcu *et al.* 1980)</sup>. Evans y Osman <sup>(1974)</sup> estudiaron la posible actividad carcinógena del ácido shiquímico en ratones, aunque sus resultados no pudieron ser confirmados en otras investigaciones <sup>(Hirono *et al.* 1977)</sup>.

Entre los tóxicos con capacidad carcinógena destaca el ptaquilosido (PT), por su potente acción tanto mutagénica como carcinógena <sup>(Niwa *et al.* 1983; Ojika *et al.* 1987)</sup>, cuya actividad ha sido confirmada en diversos estudios experimentales <sup>(Hirono *et al.* 1984; Hirono *et al.* 1987)</sup>. Esta toxina está presente en todas las partes de la planta, aunque se concentra en los rizomas, y es tóxica tanto en la planta fresca como en la planta seca <sup>(Bradley 2000)</sup>. Su proporción en el helecho puede llegar hasta el 1,3% en la materia seca y alcanza sus máxima concentración durante la primavera y el verano <sup>(Smith y Seawright 1995)</sup>.

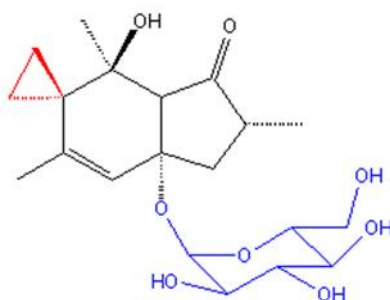


Ilustración 1. Estructura química del ptaquilosido.

El PT presenta un carácter hidrosoluble, en condiciones acuosas se transforma gradualmente en pterosina B, su forma inactiva. Sin embargo, bajo condiciones alcalinas, el PT se activa mediante la conversión en una dienona intermedia (PT activado, PTA) que es fuertemente alquilante. Esto ayudaría a explicar la localización de las neoplasias en el tracto digestivo superior y la vejiga urinaria en bóvidos y en el íleon de roedores <sup>(Smith y Seawright 1995)</sup>. El PTA presenta un anillo ciclopropilo que se abre para formar un carbo-cation altamente reactivo, que reacciona con elementos nucleófilos del medio. Así se puede unir a la molécula de agua, con lo que volverá de nuevo a su forma inactiva (pterosina B) o bien puede unirse a los nucleótidos del ADN con los que forma productos de alquilación en secuencias de bases específicas. Las secuencias creadas son parecidas a las que reaccionan con otros carcinógenos que contienen ciclopropanos <sup>(Hurley *et al.* 1988)</sup>. La alquilación del ADN induce la aparición de mutaciones puntuales <sup>(Smith *et al.* 1994)</sup>, con lo que podría ser el primer paso en la iniciación de la carcinogénesis. El PT también reacciona con el ADN de manera covalente en condiciones neutras, y crea puentes con sus bases nitrogenadas, en especial con el N3 de las adeninas <sup>(Kushida *et al.* 1994; Smith *et al.* 1994)</sup>. En condiciones fisiológicas se dan roturas espontáneas de las uniones N-glicosídicas, creándose sitios muy inestables que conducen a la rotura de la estructura del ADN a través de la reacción de beta-eliminación <sup>(Kushida *et al.* 1994)</sup>. En condiciones normales las modificaciones de carácter individual producidas por el PTA en el ADN pueden repararse en un corto período de tiempo. No obstante, en algunas de estas lesiones se pueden producir reparaciones erróneas que pueden dar lugar a mutaciones de ciertos genes iniciando la formación de tumores, lo que explicaría la carcinogénesis inducida por los helechos a nivel celular y molecular <sup>(Shahin *et al.* 1999)</sup>. Antes de que

aparezca cualquier signo histopatológico de neoplasia, las mutaciones son detectadas en H-ras, un oncogén que se asocia a varios tipos de cáncer. La presencia de los cambios en el ADN también ha sido demostrada en las lesiones de vejiga urinaria de los animales expuestos al consumo de helechos (Sardon et al. 2005). En este caso también se ha comprobado un aumento de las mutaciones en el gen H-ras en cistitis crónicas y tumores en vacas con acceso a pastos ricos en helechos de forma natural (ilustración 2).



**Ilustración 2. Planta de helecho (*Pteridium aquilinum*).**

### **Modificaciones de la actividad carcinogénica del helecho**

Existen diversos factores que pueden variar la actividad carcinogénica del helecho. Esta actividad puede verse afectada tanto por las condiciones geográficas y ambientales como por la variedad de la planta. Aunque *P. aquilinum* L var *esculentum* no ha sido tan estudiada como la variedad *aquilinum* parece ser bastante menos tóxica para los animales (Surman 1986). En regiones de China, donde la hematuria enzoótica es endémica, existen dos especies de helecho predominantes *P. aquilinum* var *latiuscum* y *P. revolutum*. De acuerdo con los estudios de Xu et al. (1992) ambas presentan una carcinogenicidad similar; sin embargo, los hechos observados en las diferentes provincias chinas donde se distribuye la hematuria enzoótica, sugie-

ren que la variedad *P. revolutum* es el principal responsable del proceso (Xu 1992). Estos datos adquirieron consistencia tras un estudio que determinó la actividad carcinogénica relativa de las distintas variedades de helecho en ratas Sprague-Dawley y Wistar (Evans 1987). También parece que las diferentes variedades de *P. aquilinum* presentan diferentes actividades carcinogénicas y mutagénicas (Fenwick 1988).

Las opiniones sobre el efecto de la madurez de la planta varían según los investigadores. Según Hirono, la actividad disminuye con la madurez (Hirono *et al.* 1975), sin embargo Smith *et al.* (1988) opinan que la edad de la planta es irrelevante. Por otro lado la actividad carcinogénica del helecho también puede variar en función de la parte de la planta examinada. Hirono observó un aumento de la incidencia de tumores en ratas cuando se alimentaban con dietas ricas en frondes jóvenes en comparación con aquellas dietas compuestas únicamente de rizomas (Hirono *et al.* 1973). Hecho confirmado por un estudio en el que se demostró que las mayores concentraciones de PT se encontraban en los frondes jóvenes (Smith *et al.* 1994).

El procesado del helecho, especialmente cuando se somete a altas temperaturas, produce una considerable reducción de la toxicidad, si bien no elimina completamente sus efectos cancerígenos (Hirono *et al.* 1972). Esto es atribuible a la inestabilidad térmica de los principios activos. Así mismo, su almacenamiento también reduce la actividad de las toxinas (Kawai *et al.* 1981) posiblemente como consecuencia de la acción de las  $\beta$ -glucosidasas que transforman los glucósidos precursores en carcinógenos inestables.

Otro de los factores que influyen en el efecto carcinógeno de los principios activos que se encuentran en el helecho es la duración de la exposición a los mismos, así cuando los animales se alimentan con helechos durante lar-

gas temporadas se favorece la aparición de lesiones en la vejiga urinaria y en el intestino (Price y Pamukcu 1968). De esta forma, el consumo prolongado de helechos, en pequeñas cantidades, favorece el desarrollo de tumores vesicales en bóvinos, mientras que la ingestión de grandes cantidades en períodos cortos de tiempo provoca un cuadro hemorrágico agudo fatal debido a que se origina una aplasia severa de la médula ósea (Evans y Mason 1965; Evans 1968). La especie animal también es un factor determinante en la susceptibilidad a la actividad carcinogénica del helecho. Así, mientras que el ganado vacuno parece ser el más sensible a estos efectos, el ganado ovino se ve mínimamente afectado por la actividad cancerígena. En cuanto a los équidos, estos son resistentes a la acción de los agentes cancerígenos del helecho, aunque sensibles a otros tóxicos de la planta (Fenwick 1988).

Por último, uno de los factores más determinantes en la actividad carcinógena del helecho es la composición de la dieta del animal (Pamukcu *et al.* 1970; Ertürk *et al.* 1974). Así se ha visto que la suplementación de dietas ricas en helechos con tiamina aumenta considerablemente la incidencia del carcinoma de vejiga urinaria en ratas (Pamukcu *et al.* 1970) lo que se ha atribuido a una modificación de la absorción, distribución, metabolismo y excreción del carcinógeno. Los nitratos y nitritos añadidos a la dieta también aumentan la frecuencia de aparición de tumores vesicales asociados al consumo de helechos (Ertürk *et al.* 1974). Por el contrario, el uso prolongado de fenotiacinas asociado a una dieta rica en helechos provocó una importante reducción de la frecuencia de tumores intestinales y vesicales en ratas (Pamukcu *et al.* 1971). Del mismo modo, aquellas dietas que contienen altos niveles de polivinilpirrolidona y cloruro de calcio inhiben el desarrollo tumoral hasta un 80% aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual se produce esta inhibición (Pamukcu *et al.* 1977). La

administración de disulfiram e hidroxianisol butirato, en ratas alimentadas con dietas ricas en helechos, también disminuyen la aparición de tumores intestinales probablemente por sus propiedades antioxidantes (Pamukcu et al. 1977), al igual que ocurre con la administración bicarbonato sódico (Hirono et al. 1972).

### **Intoxicación en monogástricos por helechos**

La tiaminasa, enzima que destruye la tiamina o vitamina B1, es una de las toxinas presentes en el helecho. Por ello, la intoxicación que se produce en los monogástricos, debido al consumo de esta planta, está relacionada precisamente con la falta de esta vitamina, que se traduce en una desmielinización de los nervios periféricos (Bradley 2000).

La ingestión de helechos por los caballos sólo se produce en épocas de escasez de alimentos, o de forma accidental mezclado con el heno que ingieren, o bien con la cama. El primer signo clínico que aparece, en casos agudos, es la pérdida de peso. Tras éste, aparece una posición rígida, con las extremidades separadas y la espalda arqueada, así como debilidad extrema y temblores musculares cuando son forzados a caminar. En las fases últimas del proceso se produce aumento del ritmo cardíaco e hiperemia, el animal permanece en decúbito y termina produciéndose su muerte a los 2-10 días de la aparición de los primeros signos clínicos (Fenwick 1988; Bradley 2000).

Al mismo tiempo, los estudios experimentales llevados a cabo en porcino en los que se administraban dietas ricas en helechos, mostraron un rápido deterioro de los animales que presentaban severas lesiones cardíacas (Evans et al. 1972).

## Intoxicación aguda en rumiantes

Al contrario de lo que ocurre en monogástricos, en los rumiantes, la tiamina no es la responsable de los efectos adversos tras la ingestión de helechos, debido a que estos animales no dependen del aporte externo exclusivo de la tiamina ya que esta se sintetiza por las bacterias intestinales (Dirksen *et al.* 2005 ).

Por lo tanto, la acción negativa de los helechos en rumiantes se relaciona con otras toxinas/carcinógenos, especialmente el PT. En estos animales la intoxicación aguda aparece tras la ingestión de grandes cantidades de helechos durante un período de 1 a 3 meses. La primera descripción conocida en ganado vacuno como un síndrome hemorrágico agudo se asoció a un período de sequía en el que la disponibilidad de alimentos adecuados estaba restringida (Penberthy 1893; Storrar 1893).

Posteriormente, Almond <sup>(1984)</sup> demostró que este síndrome estaba producido por la ingestión masiva de helechos. Los signos clínicos más frecuentes fueron anorexia y fiebre y los análisis clínicos mostraron anemia, leucopenia ( $1000/\mu\text{l}$ ) y trombocitopenia (menos de  $40000/\mu\text{l}$ ) debido a una reducción de la granulopoyesis y trombopoyesis, producida por la acción del PT sobre la médula ósea. No obstante, la serie eritrocítica de la médula ósea sólo se ve afectada en estadios terminales de la enfermedad (Hirono *et al.* 1984; Surman 1986; Xu 1992; Divers y Van Metre 2002; Van Metre 2009). También se observó una retracción de los coágulos sanguíneos, aunque los tiempos de coagulación y protrombina se mantuvieron dentro de la normalidad (Evans 1958; Jarrett *et al.* 1978; Van Metre 2009).

Por último, un estudio realizado recientemente en las Islas Azores (Portugal) en vacas de entre 4 y 21 meses de edad, que habían ingerido helechos de forma aguda, mostró que la sintomatología principal fue el sangrado



cutáneo en orejas y hocico por aumento de la fragilidad capilar, así como una marcada panleucopenia (Pinto *et al.* 2007). El estudio histopatológico reveló lesiones congestivas y hemorrágicas en las serosas, petequias en abomaso, úlceras y necrosis intestinales y petequias en la mucosa de la vejiga urinaria (Pinto *et al.* 2007). Así como aplasia de la médula ósea caracterizada por una disminución en las series granulocítica y trombocítica (Hirono *et al.* 1984; Xu 1992).

En estos animales la muerte suele producirse por las septicemias que se desarrollan por la atrofia severa de la médula ósea (Jarrett *et al.* 1978). Las hemorragias y úlceras producidas en la mucosa y submucosa del tracto digestivo, debidas principalmente a la trombocitopenia, favorecen la entrada de bacterias y la neutropenia favorece su diseminación. Esto provoca infartos hepáticos, renales, cardíacos o pulmonares por la formación de trombos bacterianos en los vasos sanguíneos (Radostits y Done 2007). De forma excepcional, se puede producir edema laríngeo asociado a la alteración de mastocitos tisulares y la liberación de histamina (Radostits y Done 2007).

### **Intoxicación crónica en rumiantes**

El ganado vacuno expuesto al consumo prolongado de helechos desarrolla una intoxicación crónica. Ésta se manifiesta principalmente en animales entre los 4 y los 12 años. Diversos estudios han mostrado que la intoxicación crónica por helechos presenta dos manifestaciones clínicas diferentes (Gabriel *et al.* 2009). Una de estas formas clínicas se caracteriza por el desarrollo de carcinomas de células escamosas en el tracto digestivo superior, lo que se traduce en una pérdida progresiva de peso, atonía ruminal, tos, disfagia y regurgitación, y, en algunos casos, anemia no regenerativa. Morfológicamente se pueden observar hasta 22 tipos de cambios, tanto neoplásicos como no

neoplásicos, que incluyen cambios generales e inflamatorios de la lámina propia, hiperplasias y neoplasias<sup>(Maxie y Jubb 2007)</sup>.

La otra forma clínica es la conocida como hematuria enzoótica bovina (HEB), que se caracteriza por pérdida progresiva de peso, hematuria y neoplasias en vejiga. En este caso, y debido a la presencia de los tumores vesicales y al engrosamiento de la pared, se origina disuria, poliaquiuria, e incluso a veces obstrucción uretral por la existencia de coágulos en la luz<sup>(Gabriel et al. 2009)</sup>. El análisis citogenético de células de sangre periférica de vacas que pastaban helechos de forma natural reveló la presencia de aberraciones cromosómicas<sup>(Moura et al. 1988)</sup>. Morfológicamente se caracteriza por la presencia tanto de lesiones neoplásicas como de no neoplásicas, causando cambios epiteliales e inflamatorios en la lámina propia y tumores mesenquimatosos y epiteliales, la mayoría de ellos de carácter maligno<sup>(Gabriel et al. 2009)</sup>.

La HEB, ha sido estudiada en su presentación natural, en varias zonas del mundo en los últimos años. Los lugares de estudio, como Bolivia, Brasil, Venezuela, Rumania, Italia y Portugal (Islas Azores), se han seleccionado por la alta incidencia de HEB y la abundancia de helechos en los pastos<sup>(Marrero et al. 2001; Sánchez-V et al. 2004; Falbo et al. 2005 ; Pinto et al. 2007; Giurgiu et al. 2008; Gabriel et al. 2009; Di Loria et al. 2011)</sup>. Los animales estudiados presentaban HEB clínica con macro-microhematuria y diversas alteraciones hemáticas y neoplasias en vejiga urinaria. Sin embargo, en ninguno de los estudios publicados se analiza el total de la población expuesta al consumo de helechos, incluyendo animales sin signos clínicos de HEB, sino que se seleccionan para los estudios vacas que ya han desarrollado la enfermedad y presentan las alteraciones ya mencionadas. No existen estudios analíticos sobre poblaciones de vacas

expuestas al consumo de helechos que todavía no hayan desarrollado la enfermedad.

En otro estudio en el que se observó hematuria en todos los animales estudiados, a nivel hematológico se confirmó la presencia de una anemia no regenerativa (Giurgiu et al. 2008). Recientemente se ha descrito un aumento de algunos factores hemostáticos como el fibrinogeno y la proteína C en vacas que padecían HEB asociada a la presencia de tumores en la vejiga (Di Loria et al. 2011).

## **C. Riesgos para la salud humana**

La población humana consume helechos de forma directa en algunos países como Japón o Brasil. Tras lo descrito previamente es importante tener en cuenta que los principios activos que se encuentran en los mismos pueden ser potencialmente tóxicos para el hombre. Es cierto que la toxicidad de estos productos así como su potencial carcinógeno, disminuyen tras ser tratados con calor (cocinado) o con productos químicos, como el bicarbonato sódico, pero no desaparece completamente (Hirono et al. 1975). De hecho, existen estudios que asocian el consumo directo de helechos con el aumento de la prevalencia de cáncer de esófago en zonas centrales de Japón (Kamon y Harayama 1975).

### **Consumo de leche contaminada con PT**

Un aspecto relevante en el estudio de la carcinogenicidad del PT viene siendo desde hace unos años la contaminación de este compuesto en la leche

de vacas que consumen helechos (Evans et al. 1972; Hirono et al. 1987). Alonso-Amelot et al. (1996) realizaron una serie de estudios para estimar la relación entre la cantidad de PT ingerido por vacas alimentadas por helechos y la cantidad excretada en leche. Los datos obtenidos en este estudio revelaban la presencia en leche del PT 38 horas después del inicio de la ingesta de helechos hasta alrededor de 86 horas después de la última ingestión de los mismos. La media de PT excretada en leche fue de un  $8,6\% \pm 1,2\%$  de total del PT ingerido durante el periodo completo de alimentación. Estos autores, con los datos obtenidos en su estudio, calcularon que una persona que ingiriese medio litro de leche diariamente de una vaca alimentada con dosis subtóxicas de PT, estaría recibiendo alrededor de  $11 \pm 1$  mg PT al día (Alonso-Amelot et al. 1996).

La alimentación de ratones con leche, tanto fresca como en polvo, de vacas que habían ingerido helechos provocaba la aparición de carcinomas de intestino delgado, hígado y vejiga urinaria (Pamukcu et al. 1978). Desde un punto de vista comparativo, estos hallazgos indican la existencia de un riesgo potencial para la salud humana en aquellas zonas del mundo donde la presencia de helechos en los pastos es elevada, como Turquía, Yugoslavia o Bulgaria, ya que se podría encontrar dicha molécula o sus metabolitos en la leche pasteurizada (Pamukcu et al. 1978). Diversos estudios epidemiológicos llevados a cabo en zonas con pastos ricos en helechos, como Gales, mostraron que un alto porcentaje de la población que había pasado su infancia en la zona había desarrollado cáncer de estómago (Galpin et al. 1990). Igualmente, se ha observado una estrecha relación entre la prevalencia de la HEB y el cáncer de esófago y estómago en las aldeas de las áreas montañosas de Costa Rica, don-

de las vacas se alimentan en pastos con gran abundancia de helechos (Villalobos-Salazar et al. 1989).

Los datos epidemiológicos recogidos muestran que el riesgo de ingerir compuestos carcinógenos procedentes de los helechos, como el PT, es muy alto en aquellas áreas donde la población humana consume la producción local de leche, lo que aumenta considerablemente la incidencia de cáncer digestivo en estas regiones (Villalobos-Salazar et al. 1989).

## D. Alteraciones macroscópicas e histológicas

El desarrollo de neoplasias vesicales hemangiomatosas se asocia a un síndrome, la hematuria enzoótica bovina (HEB) caracterizado por hematuria persistente, poliuria, disuria, anemia, y hemorragias {Carvalho, 2006 #656;Maxie, 2007 #1287;Radostits, 2007 #1302; Van Metre 2009}. No obstante, los cuadros varían según el período en el que la planta es ingerida, debido a la presencia de unos u otros compuestos tóxicos en el helecho. Así, además de la HEB (Rosenberger y Heeschen 1960) puede observarse otros cuadros como diátesis hemorrágica (Evans et al. 1954), o carcinomas del tracto digestivo superior (Döbereiner et al. 1967; Jarrett et al. 1978; Giurgiu et al. 2008).

Los análisis hematológicos revelan una anemia grave que puede ser no regenerativa si la supresión de la médula ósea es severa (Gabriel et al. 2009). En los recuentos hemáticos se observa trombocitopenia, leucopenia con linfopenia y neutropenia. En el urianálisis se encuentra microhematuria, proteinuria y piuria variable. Puede existir microhematuria sin que se observen tumores vesicales, pudiendo incluso aparecer sintomatología suficiente capaz de ori-

ginar la muerte (Pamukcu et al. 1976; Moura et al. 1988; Prakash 1993). La hematuria constante o intermitente constituye un signo patognomónico de esta enfermedad. No obstante, los signos clínicos varían según la presencia de posibles infecciones secundarias. Así mismo, la pérdida de sangre puede originar taquicardia, taquipnea, intolerancia al ejercicio, palidez de mucosas y una disminución en la producción acompañada de debilidad a veces extrema (Gabriel et al. 2009).

El hallazgo más frecuente en la necropsia es la existencia del tumor vesical aunque la muerte suele deberse, si el animal no es sacrificado, a septicemias como consecuencia de la inmunodeficiencia secundaria producida (Schacham et al. 1970; Smith et al. 1988).

### **Histopatología, inmunohistoquímica y alteraciones moleculares de los tumores vesicales.**

La naturaleza de los tumores vesicales asociados con la ingestión de *P. aquilinum* es variable: se han descrito tumores de distinto tipo dentro de la vejiga del mismo animal como mesenquimatosos (angiomatosos) y epiteliales (tumores mixtos), confirmándose la capacidad de producir diferentes neoplasias en distintos órganos (vejiga urinaria y aparato digestivo superior) (Tokarnia et al. 2000).

El estudio macroscópico de la vejiga urinaria de animales afectados por HEB puede revelar desde pequeñas hemorragias en la pared, a ulceraciones y masas tumorales. Su estudio microscópico muestra cistitis en fases iniciales, alteraciones epiteliales con hemorragia, y en cuanto a las lesiones de carácter neoplásico, son muy diversas según su procedencia mesenquimatosas y/o epitelial (Costa-Durao et al. 1995).

Las lesiones inflamatorias crónicas en la vejiga de la orina asociadas a HEB son de tipo folicular y polipoide. Además, también aparecen otras lesiones no neoplásicas como hiperplasia y metaplasia glandular en vejiga e intestino (Carvalho *et al.* 2006).

Según algunos autores, las neoplasias epiteliales son más frecuentes que las mesenquimatosas (Carvalho *et al.* 2006); los tumores epiteliales benignos más comúnmente observados son papilomas mientras que los tumores epiteliales malignos más frecuentes son los carcinomas de células de transición y los adenocarcinomas. Estas neoplasias muestran una acentuada malignidad histológica, con un elevado grado de anaplasia celular (Costa-Durao *et al.* 1995). En el caso de las neoplasias mesenquimatosas, son frecuentes los tumores derivados del endotelio vascular, tanto hemangiomas como hemangiosarcomas (Costa-Durao *et al.* 1995; Falbo *et al.* 2005 ; Carvalho *et al.* 2006; Carvalho *et al.* 2009). Los tumores mixtos, formados por componente epitelial y mesenquimatoso a la vez son relativamente frecuentes (Maxie y Jubb 2007).

Radostis *et al.* (2007) expusieron que los cambios tumorales en la vejiga de la orina pueden ir asociados a procesos inflamatorios crónicos en la mucosa y la submucosa. Por el contrario, Peixoto *et al.* (2003), en un estudio llevado a cabo en 59 bovinos, sugerían que las cistitis podían representar las fases iniciales del proceso tumoral. Este último autor sostiene que los procesos inflamatorios surgen como consecuencia del efecto tóxico del helechó y son previos o simultáneos al desarrollo tumoral, pero no posteriores. No obstante, debido a la coexistencia de varias lesiones en el mismo individuo, les fue imposible establecer de forma clara cuál era la lesión principal, así como un orden cronológico de aparición. En otro estudio se observó evidente proliferación de células hiperplásicas, metaplásicas o neoplásicas, que se caracte-

rizaban por ser lesiones multicéntricas con varios niveles de diferenciación (Peixoto et al. 2003). Esto también se observó en los tumores de origen mesenquimatoso, de modo que parte de los hemangiomas y hemangiosarcomas parecían estar relacionados u originados a partir de proliferaciones focales o multifocales de pequeños vasos de aspecto morfológicamente normal. Las neoplasias predominantes fueron carcinomas de células de transición (44%), seguidos por papilomas y en menor proporción, adenomas, carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas. La mayoría de las vejigas presentaban dos o más tipos diferentes de tumores.

También observaron una infiltración linfocítica difusa que en algunas localizaciones formaba agregados linfoides, estas se acompañaban de células plasmáticas y estaban próximas a las zonas de proliferación celular. Esta infiltración era más frecuente e intensa cuanto más agresiva era la neoplasia, aunque no sólo acompañaba a los tumores, sino que también aparecía en vejigas sin procesos neoplásicos (Peixoto et al. 2003). En algunas neoplasias se observó también la presencia de eosinófilos, principalmente en los carcinomas de células escamosas. En estos tumores la presencia de eosinófilos se relacionó con la antigenicidad de la queratina presente (Murphy et al. 1994).

El comportamiento biológico de las alteraciones de la vejiga de animales con HEB es diferente al que tiene lugar en las neoplasias vesicales de humanos. De hecho, en el bovino con HEB las neoplasias con severa anaplasia, evidente potencial infiltrativo e invasión vascular, raramente son capaces de metastatizar a los nódulos linfáticos regionales (Peixoto et al. 2003), mientras que en los tumores vesicales humanos, la metástasis del carcinoma de transición normalmente está asociada con la invasión tumoral de la pared tumoral y nódulos linfáticos regionales en un 14% de los pacientes (Murphy et al. 1994).



Según algunos autores, la reacción inmunológica local podría impedir la diseminación de la neoplasia (Peixoto *et al.* 2003).

Por otro lado, los tumores vesicales también han sido investigados a nivel molecular. Según algunos estudios, el gen h-ras sufre numerosas mutaciones tras la administración de una dieta rica en helechos a ganado bovino (Prakash *et al.* 1996) y tras la administración de PT a ratas (Shahin *et al.* 1998). Además son numerosas las investigaciones que reflejan que la técnica inmunohistoquímica de detección de la proteína H-ras sobre lesiones precancerosas y cancerosas de la vejiga de la orina en la especie humana y en las ratas puede ser un buen método diagnóstico (Fujita *et al.* 1988; Ward *et al.* 1988; Porter *et al.* 1994; Almudevar *et al.* 2000).

Se han encontrado mutaciones de este oncogén en el íleon de terneros alimentados artificialmente con helechos (Prakash *et al.* 1996) y previamente, en carcinomas asociados a papilomavirus del tracto alimenticio superior en ganado vacuno (Campo *et al.* 1990). Así también, se han identificado cambios en el ADN de las lesiones de vejiga de ganado vacuno expuesto al helecho además del significativo incremento de la expresión del gen H-ras en las cistitis crónicas y tumores (Sardon *et al.* 2005). El estudio citogenético de las lesiones de HEB muestra un alto porcentaje de células anormales, con una pronunciada fragilidad en los cromosomas y rotura de cromátidas (Peretti *et al.* 2007). Por otro lado, varios estudios han demostrado que en diversos tumores humanos y animales existe una elevada asociación entre la acumulación de proteína p53 en el núcleo, detectada mediante técnicas inmunohistoquímicas, y la detección de mutaciones mediante la secuenciación de ADN (Sarkis *et al.* 1993). De hecho, se ha señalado que el gen supresor tumoral p53 se en-

cuentra mutado en los tumores de ganado vacuno alimentados con he-lechos (Beniston *et al.* 2001).

### **HEB y papilomavirus bovino**

La infección causada por el papilomavirus bovino (BPV) se ha ido relacionando con la HEB. Según estos estudios, el papilomavirus actúa de forma sinérgica con los componentes del he-lechos e inducen la aparición de tumores vesicales (Campo *et al.* 1980; Campo *et al.* 1990; Campo *et al.* 1992; Campo *et al.* 1994).

El papilomavirus es un virus ADN circular perteneciente a la familia Papovaviridae. Su estructura consta de ORF de dos tipos diferentes, hasta 8 genes de expresión temprana ("early") (E1-E8) implicados en la regulación y replicación viral y dos genes de expresión tardía ("late") (L1-L2) que generan proteínas para el ensamblaje de la cápsula. El papilomavirus es un virus epiteliotropo. Las partículas de ADN viral se sitúan de forma episomal en las células basales, y tras un periodo de persistencia de la infección, sufren un proceso de integración dentro del genoma celular, produciendo un bloqueo de proteínas (p53 y Rb) con funciones importantes dentro del ciclo celular. Todo esto da lugar a una serie de alteraciones en el crecimiento y diferenciación del epitelio, junto con una serie de errores genéticos, que sientan la base para la transformación tumoral (Shah y Howley 1996).

Así, a la vez que el epitelio madura, el papilomavirus va expresando sus genes de forma secuencial. Las proteínas tardías forman la cápsula y permiten el ensamblaje de nuevas partículas víricas que repiten de nuevo el mismo ciclo (Shah y Howley 1996).

Las células epiteliales que han sido infectadas realizan funciones de defensa celular mediante una revisión de la secuencia del ADN antes de dividirse.

Este proceso se lleva a cabo gracias a una cascada de proteínas, entre las cuales se encuentran la proteína p53 y la proteína Rb. Así la célula tiende a reparar el error de la secuencia de ADN causado por la introducción del ADN viral. Se trata de una porción de ADN demasiado grande, por lo que estas proteínas llevan a la célula infectada hacia la apoptosis. Con el fin de evitar esto, el virus transcribe las proteínas E6 y E7, capaces de bloquear las proteínas p53 y Rb del ciclo celular y así proteger a la célula infectada de la apoptosis. El bloqueo de estas proteínas hace que la célula sea incapaz de reparar errores intrínsecos de ADN, con lo que irá acumulando errores genéticos. Este hecho, unido a que el proceso de apoptosis también ha sido bloqueado, hace que la célula adquiera un carácter neoplásico (<http://www.tocogineconet.com>).

Los tumores de vejiga de la orina en el ganado vacuno, así como su relación con la HEB y la ingestión de helechos han sido estudiados por algunos autores (Jarrett et al. 1978; Campo et al. 1980). Se han realizado pruebas de inoculación en vacas sanas de una suspensión del BPV con o sin adición de componentes con efecto carcinógeno, este estudio dio lugar a la aparición de tumores en casi la totalidad de los animales (Olson et al. 1965), lo que llevó a determinar el papel del papilomavirus en el desarrollo de tumores vesicales.

El BPV-1 o BPV-2 infectan el epitelio de la orina. Las sustancias inmunosupresoras presentes en el helecho favorecen la formación de lesiones preneoplásicas, que posteriormente sufren una malignización por la acción de los carcinógenos químicos de la planta. Algunos ejemplos de este efecto son los carcinomas del aparato digestivo en vacuno asociados a infecciones por papilomavirus, donde se ha visto que se dan mutaciones que llevan a una activación del gen h-ras (Campo et al. 1990).

En Escocia se ha asociado la alta frecuencia de neoplasias del tracto digestivo en el ganado vacuno con la infección por el virus BPV-4 y la ingesta de heleichos (Jarrett et al. 1978; Campo et al. 1980). De hecho, el 30% de los animales estudiados con tumores digestivos además presentaban hemangiomas, heman-giosarcomas, fibromas, carcinomas de las células de transición y adenocar-cinomas de la vejiga de la orina (Jarrett et al. 1978).

Así, también se ha estudiado la relación entre el papilomavirus bovino y los factores ambientales. Se ha observado que el BPV-4 es uno de los agentes etiológicos causantes de carcinomas en el tracto digestivo (Pennie y Campo 1992), además se ha hallado ADN del BPV-2 en casi la mitad de los tumores vesi-cales del ganado bovino así como en un 69% de los tumores reproducidos experimentalmente en terneros alimentados con heleichos (Campo et al. 1992).

## **E. Diagnóstico de la HEB**

El diagnóstico suele basarse en la historia clínica: animales en los que se sospecha la ingestión de heleichos durante un largo periodo de tiempo, con síndrome hemorrágico y depresión de la médula ósea con trombocitopenia y leucopenia. En el examen post-mortem, además de masas tumorales en vejiga urinaria, se pueden encontrar hemorragias difusas en varios órganos, como boca, vagina y sistema digestivo (Knight y Walter 2003).

A la hora de llevar a cabo un diagnóstico ante-mortem es importante reali-zar un diagnóstico diferencial, que no siempre es sencillo. El diagnóstico diferencial entre hematuria y hemoglobinuria, que se da en alteraciones hemolíticas, se puede realizar mediante el examen de suero para la detec-ción de hemólisis y del sedimento urinario fresco para la detección de eri-

trocitos. Además, la ausencia de la ictericia, característica de los procesos hemolíticos, ayuda a verificar el diagnóstico (Van Metre 2009).

En el caso del diagnóstico diferencial con procesos infecciosos del aparato urinario, se debe valorar la piuria y la bacteriuria, que suele ser moderada en los casos de HEB (Van Metre 2009).

Se debe tener en cuenta que la hematuria sólo aparece en los casos en los que el tumor de vejiga urinaria es angiomatoso o presenta hemorragias, de modo que en los casos en los que el tumor es de tipo epitelial, la ausencia de hemorragia dificulta el diagnóstico (Maxie y Jubb 2007).

En 2002 se realizó un estudio ecográfico de la vejiga urinaria de ganado bovino con HEB (Sandoval *et al.* 2002) que revelaba una serie de imágenes compatibles con esta patología. Durante esta investigación se hallaron lesiones papilares pedunculadas, con origen en la pared vesical, que sobresalían hacia la luz de la vejiga y también se encontraron lesiones erosivas con pérdida de continuidad de la pared, rodeadas de zonas hipoeecogénicas y anecogénicas. Éstas últimas se apreciaron en el 100% de los animales diagnosticados de HEB, además estas observaciones fueron compatibles con los hallazgos anatomopatológicos post-mortem, por lo que se pudo demostrar la utilidad de la evaluación ecográfica para el diagnóstico de la enfermedad. Existen otras intoxicaciones que también pueden cursar con lesiones hemorrágicas, como las producidas por el trébol dulce y algunos tipos de hongos, aunque en estos casos las lesiones hemorrágicas son más graves. El tricloroetileno de la semilla de soja y la furozolidona causan en terneros un síndrome parecido a la HEB con aplasia de médula ósea, hemorragias y anemia. En este caso el diagnóstico diferencial sólo se podría llevar a cabo conociendo la historia clínica del animal (Jones y Hunt 1997).

Hasta el momento, el diagnóstico más certero es el diagnóstico post-mortem mediante el estudio anatomopatológico de la vejiga urinaria. Sin embargo este proceso no es una práctica habitual en matadero ya que en España no se suele realizar la apertura de la vejiga durante los procesos de carnización, práctica que sí se lleva cabo en otros países, como las Islas Azores donde, debido a su alta prevalencia, la vejigas son estudiadas sistemáticamente en todos los animales que llegan a matadero. En esta región, un 10% de las vacas adultas son rechazadas tras la carnización debido a los tumores de vejiga urinaria (Pinto *et al.* 2004).

El periodo de latencia, tiempo durante el cual se desarrolla el tumor, no muestra sintomatología asociada, de modo que el animal puede seguir alimentándose de helechos durante un largo periodo sin que se detecte ninguna variación hasta que el tumor ya se ha instaurado, lo cual supone que el animal puede estar acumulando y eliminando carcinógenos sin que sean detectados (Sardon 2006).

Con la finalidad de detectar la HEB en fase subclínica o clínica temprana se realizó un estudio del diagnóstico de HEB en 575 animales mediante métodos de tiras reactivas de orina y el examen microscópico del sedimento urinario (Sánchez-Villalobos *et al.* 2006). Los datos de los análisis se compararon con los resultados de la evaluación anatomopatológica post-mortem de 94 animales enfermos. El diagnóstico mediante el método químico de las tiras reactivas fue capaz de identificar 83 de los 94 casos con HEB y el método del examen microscópico del sedimento urinario identificó 92 de los 94 casos de animales enfermos y clasificó correctamente a los animales sanos. La evaluación del uso simultáneo en paralelo de ambas pruebas logró un 100% en todos los criterios que se establecieron para la investigación, con alta sensibilidad

y especificidad, capaces de diferenciar un bovino con HEB de un animal sano.

## **F. Terapia y control de los helechos**

En los casos de HEB, cuando aparecen los primeros signos clínicos, que consisten en la presencia de sangre en la orina, ya se han desarrollado los tumores vesicales. No existe un tratamiento efectivo para los tumores de vejiga y normalmente el animal muere por una severa anemia o por una invasión local del tumor de los tejidos alrededor de la vejiga (Schacham et al. 1970; Smith et al. 1988).

En casos más agudos, un tratamiento temprano con transfusiones de sangre y estimulantes de la médula ósea puede ser beneficioso (Radostits y Done 2007). En algunas ocasiones, el alcohol batílico ha sido usado como estimulante de la médula ósea, sin embargo, no se considera efectivo cuando los trombocitos y los leucocitos ya han sufrido una severa depresión (Osweiler y Ruhr 1986). Otro tratamiento temprano que también ha sido efectivo en alteraciones leves de médula ósea, ha sido el sulfato de protamina junto a transfusiones sanguíneas. El sulfato de protamina es un antagonista de la heparina, y por tanto, contrarrestará el incremento de la heparina que puede darse por la toxicidad del helecho (Knight y Walter 2003). En casos severos de aplasia medular se recomienda el uso de antibióticos de amplio espectro para ayudar a proteger a los animales contra infecciones bacterianas secundarias (Knight y Walter 2003). En cuanto al control de la enfermedad es necesario tener en cuenta que el consumo del helecho suele producirse cuando los animales se

encuentran en pastos pobres sin otra fuente de alimentación disponible (Perez-Alenza *et al.* 2006).

Se han descrito determinadas situaciones que favorecen la propagación de esta planta. Así, aunque los incendios controlados pueden ayudar a controlar su crecimiento, cuando tienen lugar en un momento inadecuado o son incontrolados, otorgan al helecho una ventaja competitiva respecto al resto de vegetación. Por otro lado, el corte del helecho se ha reducido por los cambios agrícolas y la tala de áreas de bosque facilita un crecimiento más vigoroso del helecho, como resultado del incremento de la disponibilidad de luz (Fenwick 1988).

El control de los pastos y su gestión adecuada ofrecen una ayuda parcial para limitar el crecimiento del helecho. El paso del ganado por los helechos jóvenes favorece su aplastamiento. Antiguamente el helecho se controlaba en parte por su cortado, ya que era usado como material de cobertura y para la camas del ganado (Hopkins 1990). Algunos autores han tratado de describir métodos de control, como el arado profundo con plantación de otros cultivos, el corte al inicio del crecimiento, uso de herbicidas o insectos y organismos que se alimenten de los helechos (Fenwick 1988), aunque no son medidas realmente eficaces. También se han barajado otros métodos como el control con herbicidas o la corrección de la acidez del suelo, así como la cría en estabulación y eliminación de los helechos en fincas determinadas (Sanchez *et al.* 2003). Sin embargo, para conseguir una máxima eficacia se deben usar varios métodos de forma combinada, actualmente no existe un método del todo eficaz más que evitar que los animales pasten en zonas libres de helechos.



## G. HEB experimental

### Bovino y ovino

En ganado vacuno se han realizado diferentes pruebas experimentales para intentar reproducir la enfermedad. Las primeras investigaciones demostraban que la ingestión de helechos, durante largos periodos de tiempo, daba lugar a la aparición de los signos clínicos de enfermedad, así como a la formación de tumores en la vejiga de la orina (Rosenberger y Heeschen 1960; Pamukcu 1963).

Los análisis sanguíneos llevados a cabo en las reproducciones experimentales de la HEB mostraban un descenso progresivo de los glóbulos blancos, sobre todo de los neutrófilos y también de las plaquetas, debido a una grave afección de la médula ósea (Pamukcu et al. 1967; Hirono et al. 1984). En estudios posteriores, los mismos autores describieron los siguientes signos clínicos: descenso de la condición corporal, pelo áspero, fiebre, diarrea y severas hemorragias que desencadenaban la muerte del animal (Pamukcu et al. 1976). Estos autores también observaron la presencia de tumores primarios muy similares a los producidos por la enfermedad en condiciones naturales. En la necropsia destacaban la presencia de masas tumorales en la vejiga de la orina así como múltiples zonas hemorrágicas en el tejido subcutáneo, mucosa oral y nasal, y en órganos como corazón pulmones e hígado.

Por el contrario, diversos estudios mostraron que los ovinos eran menos susceptibles al desarrollo de la enfermedad que el ganado vacuno. Se confirmó la reproducción de la degeneración progresiva de la retina en ovejas a las que se había administrado PT (Hirono et al. 1993). Así, Evans et al. (1989) publicaron un estudio en el que indujo experimentalmente avitaminosis B en

ovejas adultas con dietas que contenían un 15-30% de rizomas de helechos. Por el contrario se han descrito brotes de intoxicación aguda por helechos tras administrar 6 mg de PTA intragástricamente a ovejas (Shahin *et al.* 1998), que desarrollaron apoptosis en los hepatocitos, necrosis isquémica en riñón y aplasia medular. En concordancia con estos resultados se han publicado casos naturales de brotes de intoxicación aguda por helechos en Inglaterra (Parker y McCrea 1965) y en Australia, donde Sunderman (1987) describió la muerte de 120 animales de un rebaño merino de 450 ejemplares.

La ingestión de polvo de helecho en corderos produjo, a los cuatro meses, una degeneración progresiva de la retina que se volvió a reproducir en la segunda parte del estudio añadiendo directamente PT a la ración normal de otros corderos (Hirono *et al.* 1993).

## Roedores

Los roedores han mostrado ser sensibles a la administración oral de los principios activos con capacidad cancerígena del helecho. En diferentes estudios realizados en ratas, dependiendo de la dosis y del tiempo de exposición, se han observado múltiples neoplasias del íleon, esófago, faringe, vejiga y glándulas mamarias (Hirono *et al.* 1987).

En ratones, los efectos carcinógenos del helecho, fueron confirmados por Evans y Mason (1965), que comprobaron el desarrollo de múltiples carcinomas en íleon tras ser alimentadas con una dieta a base de helechos durante 64 días. Posteriormente este hallazgo fue confirmado en otros estudios (Price y Pamukcu 1968; Hirono *et al.* 1970) así como se demostró la inducción de tumores en la vejiga urinaria (Pamukcu y Price 1969) y en las glándulas mamarias (Hirono *et al.* 1983). El

estudio histopatológico de dichos tumores reveló la presencia de papilomas, carcinomas, adenocarcinomas y sarcomas <sup>(Yoshikawa *et al.* 1981)</sup>.

Posteriormente Hirono *et al.* <sup>(1987)</sup> llevó a cabo un estudio experimental en el que demostró que la administración de PT en la dieta a ratas daba lugar a una pérdida progresiva de peso, incontinencia urinaria, hematuria y la presencia de tumores en íleon y vesicales. Los tumores encontrados en íleon fueron principalmente adenocarcinomas, carcinomas papilares y carcinomas anaplásicos, mientras que los tumores vesicales se correspondían con carcinomas de células escamosas, carcinomas de células de transición y sarcomas.

Además de todo esto, también se han realizado pruebas comparando los efectos de la administración de PT inactivo y PTA por vía intravenosa en ratas <sup>(Shahin *et al.* 1998)</sup>. En ambos casos se demostró una disminución del peso de los animales, monocitosis y un marcado aumento de los valores de TNF $\alpha$ , así como la presencia de carcinomas y adenocarcinomas de glándulas mamarias.

Junto a las ratas, los ratones también han sido empleados en el estudio del efecto carcinogénico de los helechos. Así, Yasuda *et al.* <sup>(1974)</sup> realizaron un experimento en el cual alimentaron a ratonas gestantes ICR-JCL con dietas que contenían un 33% de helechos. Los fetos desarrollaron anomalías en las costillas, fusiones incompletas de las esternonas y defectos en la osificación. Además, los neonatos presentaron fenómenos de cariorrexis en células de la capa granular del cerebelo y formación de rosetas en la capa neuroblástica de la retina <sup>(Fujimoto *et al.* 1987)</sup>. Al mismo tiempo, Hirono *et al.* <sup>(1975)</sup> describieron el desarrollo de tumores en la región terminal del yeyuno en un estudio similar con ratones. Así como el desarrollo de leucemia y tu-

moreos pulmonares en ratonas alimentadas con helechos durante un período más prolongado de tiempo (15 meses) (Pamukcu *et al.* 1972).

Finalmente, se han utilizado ratones para llevar a cabo estudios sobre el efecto carcinogénico de los metabolitos que se encuentran en la leche de vacas alimentadas con helechos (Pamukcu *et al.* 1978; Villalobos-Salazar *et al.* 1990). Este estudio permitió concluir que se eliminaban en la leche una gran variedad de metabolitos procedentes de los productos carcinogénicos de los helechos.

### **Otras especies**

Los efectos de los componentes del helecho han sido estudiados también en otras especies animales como cobayas o conejos.

En los estudios realizados en cobayas se ha observado que la administración de helechos en la dieta induce la formación de adenocarcinomas intestinales y carcinomas de células de transición (Evans *et al.* 1984; Bringuier *et al.* 1995).

Además, cuando se administra oralmente un extracto concentrado de helecho, se origina en las cobayas un síndrome similar a la HEB, con edema vesical, hemorragias y hematuria (Saito *et al.* 1987). También fue posible reproducir experimentalmente las cistitis hemorrágicas en cobayas tras la administración de glucósidos del helecho con actividad inflamatoria como la braxina C (Yoshida y Saito 1994).

En conejos, Asano *et al.* (1989) describieron un efecto vasoconstrictor tras la administración intravenosa de PT. Posteriormente se produjo hematuria y anemia, así como muerte del animal cuando la dosis fue alta.

## H. Monocitosis en el ganado vacuno

Los monocitos son leucocitos de la serie de los agranulocitos, que se caracterizan por tener un núcleo de forma variable y un citoplasma de color azul-gris, que se vacuoliza frecuentemente. Están ausentes, o presentes en cantidades reducidas (2-7% del total de leucocitos), en la sangre periférica y son muy similares morfológicamente y cuantitativamente en todas las especies domesticas.

En ganado vacuno adulto se estiman valores normales de hasta 3000 por  $\text{mm}^3$  con un rango que varía entre 0-6% (Plonait 1980) ó 2-7% de los leucocitos (Weiss *et al.* 2010). Morfológicamente tienen un diámetro de 15-20  $\mu\text{m}$  y los núcleos pueden tener formas diversas: ovales, ovales con una única muesca en forma de riñón o con múltiples muescas o lóbulos. La cromatina nuclear tiene un aspecto finamente granular en forma de encaje o de red, con pocas áreas de condensación. El citoplasma es de tamaño moderado de color azul grisáceo y pueden tener vacuolas múltiples de varios tamaños. La principal variación de la morfología monocítica es que algunos, carecen de vacuolas destacadas y pueden confundirse con neutrofilos en banda o linfocitos atípicos (Reagan *et al.* 1999).

La monocitopoyesis se realiza en la medula ósea a partir de células madre precursoras de granulocitos y monocitos. En la medula ósea aparecen muy pocas células de la familia de los monocitos, los monoblastos son las primeras células reconocibles pero son difíciles de diferenciar de los mieloblastos, estas dan lugar a los promonocitos, células grandes de núcleo oval, a veces dentado con cromatina reticular y se pueden confundir con mielocitos y metamielocitos neutrofilos (Reagan *et al.* 1999).

Desde la producción por las células madre precursoras de los monocitos, en la medula ósea, hasta su aparición en la sangre, transcurren uno o dos días. Como en la medula ósea apenas hay reservas, la monocitosis es el resultado de una intensa multiplicación celular. La cantidad de monocitos en sangre puede aumentar veinticuatro horas después del contacto con el agente toxico o infeccioso, hasta 3-4 veces los valores iniciales. La vida media en sangre es de unos 2-3 días, después los monocitos migran a los tejidos transformándose en macrófagos, con una vida media de 100 días <sup>(Plonait 1980)</sup>. En el pulmón se transforman en macrófagos alveolares, en el hígado (células de Kupffer) y también se depositan en sinusoides del bazo, medula ósea, cavidades pleural y peritoneal. Los monocitos sanguíneos y los macrófagos de los tejidos, fagocitan y matan a los microorganismos. Se diferencian de los polimorfonucleares en que están bajo la dirección de los linfocitos T, por medio de un sistema complejo basado en las linfocinas <sup>(Reese y Richard 2005)</sup>.

Bajo el efecto de distintos agentes patógenos, los leucocitos circulantes en sangre pueden estar temporalmente disminuidos (leucopenia) o aumentados (leucocitosis). Según el grado, tipo y duración del daño pueden estar afectadas mayoritaria o exclusivamente ciertas células (eosinofilos, neutrofilos o elementos linfáticos)<sup>(Reese y Richard 2005)</sup>.

Debido al cuadro linfocitario del bovino aparecen reacciones de leucopenia, especialmente frecuentes e intensas por el efecto del estrés. Una leucopenia pasajera se observa al comienzo de muchas enfermedades infecciosas o intoxicaciones graves. Una disminución más prolongada de todos los tipos de células blancas (panleucopenia) se produce sobre todo en enfermedades virales, parásitos sanguíneos y septicemias bacterianas <sup>(Dirksen et al. 2005)</sup>. Se

observa una disminución notable de los leucocitos polimorfonucleares (agranulocitosis) en diátesis hemorrágica y daños de la medula ósea.

La leucopenia dura un promedio de cuatro días y afecta especialmente a bovinos con daños hepáticos y con graves enfermedades infecciosas (paratuberculosis, salmonelosis). Se trata de neutropenia y linfopenia. En numerosas enfermedades agudas se observa eosinopenia.

La leucopenia inicial por estrés (Plonait 1980; Dirksen et al. 2005 ), en el organismo sano, se continúa con una neutrofilia, por ejemplo debido a transportes, partos, celos. Las leucocitosis más intensas se producen en enfermedades infecciosas agudas, sobre todo bacterianas, así como en todas aquellas en las que hay destrucción tisular y supuración. También se observa un aumento de ciertos leucocitos como las eosinofilias en enfermedades de piel y mucosas, alergias y distintas parasitosis.

Las acciones agudas agrupadas bajo el termino estrés provocan en principio un estímulo del sistema neuroendocrino, en especial hipófisis y adrenal. Este estímulo tiene como consecuencia una disminución de los elementos eosinofílicos y linfáticos y un aumento de los leucocitos neutrófilos circulantes, apareciendo la granulocitopoyesis. En patologías que se cronifican, (persistencia del estímulo) se producirá la disminución de la multiplicación de los granulocitos y el aumento sostenido de linfocitos y monocitos.

La monocitosis, definida como un aumento del número de monocitos en sangre puede estar producida por distintas causas. En el ganado bovino se ha descrito en enfermedades crónicas por un estímulo crónico sobre el sistema retículo endotelial como la tuberculosis, micosis, listeriosis, brucelosis, toxoplasmosis, abscesos múltiples y en presencia de tumores de la medula ósea como la leucosis monocítica (Dirksen et al. 2005 ). Tras la administración de

medicamentos como la dexametasona (Anderson *et al.* 1999) se observa monocitosis asociada a leucocitosis, neutrofilia, eosinopenia y linfopenia. Los monocitos también aumentan en casos de estrés, por la liberación de cortisol en el parto (Meglia *et al.* 2001; Meglia *et al.* 2005) o por la reacción a la presencia de parásitos sanguíneos (*Trypanosoma vivax*) (Silva *et al.* 1999), o a causa de la ingestión prolongada de plantas tóxicas (Perez-Alenza *et al.* 2006; Gabriel *et al.* 2009). La administración endovenosa en ratas de sustancias carcinogénicas del hebrecho como el PT y PTA induce la aparición de monocitosis e incremento del TNF (Shahin *et al.* 1998). Una alimentación basada en semillas de *Jatropha curcas*, planta con efecto acaricida administrada a conejos parasitados por garrapatas, produce también una monocitosis (Abdel-Shafy *et al.* 2011).





## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

Este trabajo constituye un estudio inicialmente descriptivo en el que se pretenden conocer las posibles alteraciones analíticas urinarias y/o sanguíneas en diversas explotaciones de ganado vacuno expuestas al consumo de helechos, incluyendo mayoritariamente animales sin hematuria clínica. La ausencia de estudios previos semejantes y, por tanto, del correspondiente conocimiento científico adecuado (base de la hipótesis) impide el planteamiento de hipótesis concretas, siendo la hipótesis general que es posible que algún factor analítico de aparición temprana sirva de indicador diagnóstico precoz de la enfermedad.

Los **objetivos** del estudio son:

1. Estudiar las características clínicas de la HEB natural y su prevalencia en varias explotaciones de ganado vacuno en extensivo de dos regiones geográficas concretas: Plasencia (Extremadura) y zona del Sistema Central (Madrid), en relación con el manejo nutricional.
2. Conocer las posibles variaciones analíticas sanguíneas y urinarias de los animales expuestos al consumo crónico de helechos con y, sobre todo, sin hematuria clínica.
3. Determinar mediante análisis estadísticos multivariantes si existen asociaciones de grupos de parámetros analíticos que puedan servir, en conjunto, para definir posibles grupos o clases analíticas o estados de la enfermedad.

4. Relacionar las posibles variaciones o alteraciones analíticas con el cuadro lesional macroscópico e histológico en un reducido número de animales, mediante la realización de necropsias.
5. Valorar el posible uso diagnóstico de parámetros clínicos analíticos o sus combinaciones. Dado que la manifestación clínica de la HEB supone una fase avanzada de la de la misma, se pretende determinar si algunas de las alteraciones analíticas aparecen de forma precoz y pueden ser empleadas para el diagnóstico temprano de HEB.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### **A. Diseño del estudio**

Para el estudio de los valores analíticos de los animales expuestos al consumo de helecho se ha realizado un estudio epidemiológico transversal en tres explotaciones de ganado vacuno con exposición natural al helecho, en dos periodos concretos de tiempo: primavera-verano de 2002 y otoño de 2011.

### **B. Descripción del ganado y su manejo**

Se seleccionaron tres explotaciones de ganado vacuno en régimen extensivo o semiextensivo, con historial previo de hematuria y sospecha de ingesta de helechos. En las tres explotaciones existía un historial clínico de animales afectados por HEB durante los últimos años igual o superior al 4% de las vacas y varios casos referenciados de intoxicación aguda por helechos.

El estudio fue llevado a cabo en tres explotaciones (de dos zonas geográficas distintas: Plasencia y Sierra de Madrid) con un sistema de alimentación extensivo y semiextensivo, que variaba según la época del año. En cualquier caso, tenían un manejo nutricional (suplemento con forraje y concentrado) diferente:

- Explotación A, localizada en Plasencia (Cáceres) de régimen extensivo sin suplemento adicional de alimento en época de pastos. Du-

rante este periodo los animales solo comían el pasto natural existente "a diente" (ilustración 3).

- Explotación B, localizada en Los Molinos (Madrid), los animales recibieron un suplemento adicional ocasional en época de pastos (según necesidades).
- Explotación C, localizada en Guadarrama (Madrid), los animales eran suplementados con aporte continuo de forraje y concentrado, incluso en épocas de pasto abundante.

Las tres explotaciones estaban en zonas de pastos de montaña con una altitud superior a los 1000 metros sobre el nivel del mar. De acuerdo con el manejo extensivo y semiextensivo los animales de las tres explotaciones, pastaban periodos variables de tiempo a lo largo del año en las montañas de la zona, donde abundan los helechos. Los animales pasaban el resto de año en las llanuras o fincas cerradas cercanas, libres de helechos.

La composición del pasto en las dos zonas estudiadas, era muy similar, se trataba de pasto de montaña de una cantidad y calidad baja, dependiendo de la climatología del año y con pocas especies de alto valor pratense y contaminado con gran cantidad de helechos, junto con bosques de pinos o melojares.

Las explotaciones estaban sometidas a los programas nacionales de erradicación de enfermedades de declaración obligatoria: tuberculosis, brucelosis y leucosis enzootica bovina, una o dos veces al año, según comarca ganadera (explotación A una vez; B y C dos veces). Todos los animales se desparasitaron en primavera y otoño con ivermectinas sistémicas y no tenían

historial analítico ni clínico de otras enfermedades infecciosas ni parasitosis sanguíneas.

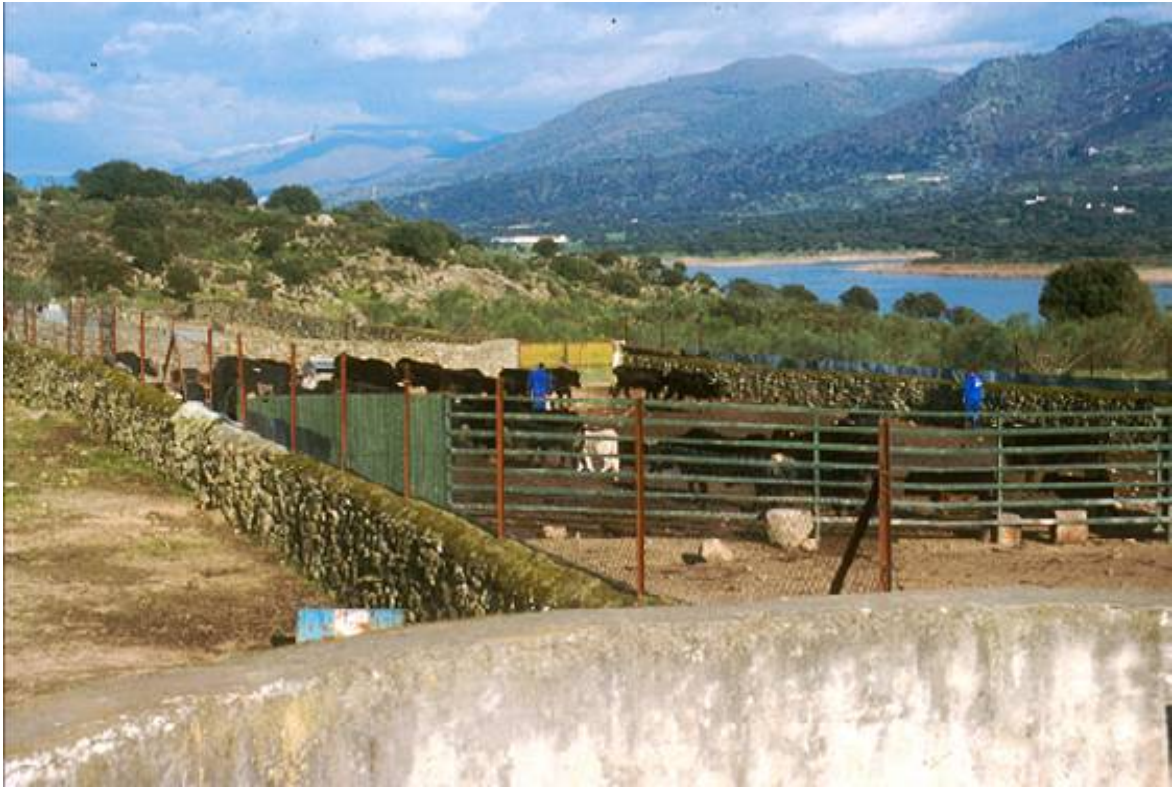


Ilustración 3. Explotación A.

### **C. Animales y grupos de estudio**

La explotación A estaba formada por 200 vacas, de raza (Avileña negra Ibérica) y se localizaba en el sureste de España (Plasencia, Cáceres, Extremadura). La explotación B estaba ubicada en una zona montañosa, al norte de la Comunidad de Madrid (Los Molinos) y estaba compuesta de 54 vacas de aptitud cárnica con cruces de las razas Avileña Negra Ibérica, Charolesa y Limusina. La explotación C, se encontraba en el municipio de Guadarrama, en la sierra norte de Madrid y estaba formada por 74 vacas de aptitud cárnica cruzadas con razas Avileña negra ibérica y Limusina.

El estudio se ha realizado en un total de 207 animales de las tres explotaciones. En la explotación A se seleccionó un grupo de animales adultos, denominado grupo A1 (n=66) y un lote de novillas de la misma explotación, denominado grupo A2 (n=13), elegidos de forma aleatoria. En las explotaciones B y C se incluyeron todos los animales: 54 de la explotación B y 74 de la explotación C. En el caso de los animales adultos, los criterios de inclusión comunes fueron: animales mayores de un año, nacidos y criados en la explotación.

Se han establecido los siguientes grupos para el estudio:

- Grupo A1: Vacas adultas (n=66) de la explotación A (edad entre 2 y 16 años; media 8,8 años, DE 3,9).
- Grupo A2: Novillas (n=13) de la explotación A (edad entre 10 a 34 meses; media 14,4 meses, DE=6,4)
- Grupo B: Vacas adultas (n=54) de la explotación B (edad entre 2 y 14 años; media 7,2 años, DE=3,2) (ilustración 4).
- Grupo C: Vacas y novillas (n=74) de la explotación C (edad entre 1 y 22 años; media 8,5 años, DE=5,5)
- Grupo D: Vacas control (n=10) del hospital clínico veterinario (edad entre 4 y 8 años; media 6,4 años, DE=2,8)



Ilustración 4. Vacas de aptitud cárnica de la explotación B

## D. Historial

Se realizó un historial completo de todos los animales incluyendo patologías previas y actuales, incluyendo el registro previo de la presencia de hematuria. Además se reflejó el tipo de comportamiento de los animales y su condición corporal (medida de 1 a 5) considerando que los valores entre 1-1,5 (categoría 1) correspondían a un estado de poca condición corporal (muy delgado), los valores entre 1,6 – 2,25 (categoría 2) a un estado delgado, los superiores a 2,25 hasta 3 (categoría 3) a un estado corporal normal, entre 3 y 4 condición corporal elevada (animales obesos) y de 4 a 5 condición corporal muy elevada (muy obesos) (Edmonson et al. 1989).



## E. Examen físico

Mediante el empleo de una manga de sujeción para ganado vacuno, se procedió a realizar un examen físico completo a todos los animales (ilustración 5):

- Grupos A1, C: temperatura rectal, examen de las mucosas, frecuencia cardiaca, frecuencia de movimientos ruminales, tenesmo urinario, disnea, melena, diarrea, timpanismo y hematuria).
- En los grupos B y A2 en función de los datos de la explotación A y ante la ausencia de signos clínicos relevantes, sólo se registró el historial de hematuria.



Ilustración 5. Manga de manejo en la explotación A.

## F. Toma de muestras

La toma de muestras de las explotaciones se realizó en el año 2002 (febrero grupos A1, mayo grupos A2 y D y julio grupos B) y en septiembre de 2011 para la explotación C.

Las muestras de sangre (grupos A1, A2, B, C) se obtuvieron a partir de la vena coccígea utilizando un dispositivo de extracción Vacutainer y tubos de vacío de 5 ml (EDTA, citrato de sodio) (ilustración 6). Las muestras de orina (grupos A1, B) se obtuvieron mediante micción espontánea o estimulada manualmente en la mayoría de los animales, teniendo que recurrir en unos pocos casos a la cateterización de la uretra mediante sonda uretral tipo Foley de 25 cm de longitud de un solo uso para cada animal (ilustración 7). En todos los casos la orina se recogió en frascos estériles con capacidad para 50 ml para su procesamiento posterior.



Ilustración 6. Toma de muestra de sangre en la explotación A.

También se recogieron muestras de sangre y orina de 10 vacas sanas adultas de raza frisona del hospital clínico veterinario de la facultad de veterinaria de Madrid, con los mismos procedimientos, que se analizaron para utilizarse como grupo control (Grupo D).



Ilustración 7. Toma de muestra de orina, micción espontanea en la explotación A

Tabla 1. Estudios realizados y número de animales en cada grupo.

Grupo	A1 (n=66)	A2 (n=13)	B (n=54)	C (n=74)	D (n=10)
<b>Historia</b>	66	13	54	74	10
<b>Examen físico</b>	64	0	0	74	10
<b>Hematología</b>	54	13	42	74	10
<b>Pruebas de coagulación</b>	62	-	-	-	10
<b>Bioquímica clínica</b>	64	13	51	-	10
<b>Urianálisis: tiras de orina</b>	59	-	43	-	10
<b>Urianálisis: laboratorio</b>	56	-	-	-	10
<b>Necropsia</b>	4	-	-	-	-

## G. Pruebas analíticas

### Hematología y bioquímica sanguínea

Las muestras de sangre de las grupos A, B y D se recogieron en 3 tubos de (EDTA, citrato de sodio y de vacío) de 5 ml de capacidad y fueron remitidos refrigerados a un laboratorio clínico veterinario (Labipath, S.A., Madrid, España) para estudiar el perfil bioquímico y hemático. Las muestras de sangre

de la explotación C se recogieron en un tubo de EDTA 5 ml, y se remitieron al laboratorio veterinario DLV (Madrid, España) para su análisis hematológico.

En función de la valoración de los parámetros analíticos estudiados en los grupos A y B se determinó realizar sólo el estudio de los valores de la hematología en el grupo C.

Los parámetros hematológicos incluyeron para la serie roja: eritrocitos ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ), hematocrito (%), hemoglobina (g/L), VCM ( $\mu\text{m}^3$ ), CHCM (g/L), HCM (pg); para la serie blanca: leucocitos, cayados, neutrofilos, eosinofilos, basofilos, linfocitos y monocitos, tanto en valores porcentuales (%) como en valores absolutos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) y finalmente trombocitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ), fibrinogeno (g/L), TP (sec) y APTT (sec).

Los datos bioquímicos analizados, incluyeron glucosa (mg/dl), urea (mg/dl), creatinina (mg/dl), colesterol (mg/dl), calcio (mg/dl), fósforo (mg/dl), hierro (mcg/dl), aspartato aminotransferasa (u/l), GGT (u/l), proteínas totales (g/L), albuminas (g/L),  $\alpha$ -globulinas (g/L),  $\beta$ -globulinas (g/L) y  $\gamma$ -globulinas (g/L).

Los parámetros hematológicos para las explotaciones A y B se midieron usando el sistema CELL\_DYN<sup>R</sup> 3500 System (Abbott Laboratorios, Illinois, EEUU). Para las pruebas hemostáticas se usó Thrombolyzer<sup>R</sup> Compact X System (Behnk Elektonik Organon Teknika, Norderstedt, Alemania). El perfil bioquímico se midió con ADVIA<sup>TM</sup> 1650 Automatic Analyzer (Bayer Diagnostics, Nueva York, EEUU). Las proteínas séricas totales se determinaron mediante refractometría y la electroforesis de la proteína sérica se llevó a cabo con Paragon<sup>R</sup> Reagent Kit (Beckman Coulter, California, EEUU). Los parámetros hematológicos para la explotación C se midieron usando el aparato de

hematología (Sysmex XT 2000i de Roche). La fórmula leucocitaria se obtuvo mediante observación microscópica de los frotis de sangre (tras tinción Panóptica de Panreac) en el microscopio Olympus BX41.

### **Urianálisis**

El urianálisis fue realizado en la propia explotación, utilizando tiras para el análisis de orina: (dipsticks, Multistix® Bayer; para los grupo A y B). En la interpretación de la prueba, se valoró la presencia/ausencia (0/1) de sangre macroscópicamente, así como los niveles de leucocitos, nitritos, glucosa, cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina, densidad, pH, microhematuria y las proteínas totales (rango: 0, 1, 2, 3).

Las muestras de orina del grupo A1 se enviaron además a dos laboratorios, el laboratorio del hospital clínico veterinario de la UCM y un laboratorio privado de análisis (Labipath, S.A., Madrid, España); la orina recolectada en contenedores estériles se centrifugó a 1500 rpm, se examinó al microscopio el sedimento y se observó la presencia de eritrocitos, células descamadas de transición (rango: 0, 1, 2, 3), células normales, neoplásicas y células inflamatorias.

## **H. Necropsia**

En función de la gravedad de los síntomas clínicos y tras el acuerdo económico y consentimiento del propietario de la explotación, se sacrificaron 4 vacas del grupo A y se les realizó la correspondiente necropsia. Se seleccionaron 3 en base a la hematuria macroscópica observada y su mal estado corporal (identificadas como N1, N2, N3). Se seleccionó para necropsia una

cuarta vaca (N4) sin historial previo de hematuria que fue encontrada tumbada en el prado con una herida grande ulcerada y se decidió sacrificarla por motivos humanitarios. En tres de los casos (N2, N3, N4) se recogieron muestras de sangre y orina antes del sacrificio y las muestras se incluyeron en el estudio (grupo A1). En el caso N1 sólo se pudo recoger orina. Las muestras de los distintos órganos se fijaron en formol 10%, se incluyeron en parafina y se hicieron cortes de 4µm que fueron teñidos con H-E para su examen histológico. Las preparaciones histológicas fueron evaluadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario.

## **I. Análisis estadísticos**

El estudio estadístico se ha llevado a cabo en el Servicio de Apoyo a la Investigación de la UCM, bajo la dirección del Dr. Pedro Cuesta. Se realizaron análisis estadísticos descriptivos y analíticos de las distintas variables incluidas: edad, historia clínica, exploración física, así como todos los parámetros sanguíneos, urinarios y bioquímicos.

Para su interpretación, los resultados de los análisis sanguíneos y urinarios se evaluaron de acuerdo a los parámetros normales de las vacas control y de referencia estableciéndose valores promedio ( $\bar{x} \pm DE$ ). Algunas variables continuas se transformaron en variables categóricas (Tabla 2). La asociación de datos epidemiológicos clínicos y analíticos de cada animal fueron estudiados estadísticamente.

Para identificar los parámetros que pudieran sugerir la presencia de cambios en un estado inicial, se realizó un análisis estadístico de variables múltiples usando el paquete estadístico SPAD <sup>(Lebart y Morineau 2001)</sup>. El análisis estadístico

de variables múltiples define la tipología de cada grupo mediante la agrupación de las vacas con características homogéneas en clases. Cada clase está caracterizada por una prueba estadística que compara la diferencia de los valores de los parámetros seleccionados en cada clase con respecto a los valores de estos parámetros en grupo total de vacas.

Para los análisis estadísticos multivariantes (en clases o grupos), sólo los animales con todos los datos completos en todas las variables estudiadas fueron incluidos en el estudio. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

**Tabla 2.** Categorización de los parámetros analizados según su rango

Parámetro	Categorías			
	0	1	2	3
<b>Condición corporal</b>		>1-1,50 (muy bajo)	>1,51-2,25 (bajo)	>2,26-3 (normal)
<b>Hematocrito</b> (%)	≤25% (bajo)	>25-30% (normal)	>30% (alto)	
<b>Eritrocitos</b> (x 10 <sup>6</sup> )	≤4,34 (bajo)	>4,34-6 (normal)	>6 (normal-alto)	
<b>Hemoglobina</b> (g/L)	≤7,55 (bajo)	>7,55-14,50 (normal)	>14,50 (alto)	
<b>Leucocitos</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)	≤3,55 (bajo)	>3,55-5,55 (normal-bajo)	>5,55-12 (normal)	>12 (alto)
<b>Cayados</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)	≤0,12 (normal)	>0,12 (alto)		
<b>Neutrófilos</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)	≤0,6 (bajo)	>0,6-1,5 (normal-bajo)	>1,5-4 (normal)	>4 (alto)
<b>Linfocitos</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)	≤2,5 (bajo)	>2,5-3,5 (normal-bajo)	>3,5-7,5 (normal)	>7,5 (alto)
<b>Monocitos</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)	>0,85 (normal)	>0,85-1,25 (alto)	>1,25 (muy alto)	
<b>Trombocitos</b> (x 10 <sup>3</sup> /μL)	>0-150 (muy bajo)	>150-300 (bajo)	>300 (normal)	
<b>Cayados</b> (%)	≤1,2 (normal)	>1,2 (alto)		
<b>Neutrófilos</b> (%)	≤6 (bajo)	>6-15 (normal-bajo)	>15-45 (normal)	>45 (alto)
<b>Linfocitos</b> (%)	≤25 (bajo)	>25-35 (normal-bajo)	>35-75 (normal)	>75 (alto)
<b>Monocitos</b> (%)	≤8 (normal)	>8-12 (alto)	>12 (muy alto)	

## RESULTADOS

---

### A. Historia y datos clínicos

#### Historial de hematuria

En el grupo A1 la anamnesis reveló que el 10% de los animales (7/66) habían tenido hematuria visible en el pasado y un 24% (16/66) tuvieron hematuria durante el periodo de estudio, mientras ninguna de las novillas de la misma explotación (grupo A2) tenía historial previo de hematuria. Los animales del grupo B tampoco tenían historial previo de hematuria pero en el 3% de las vacas se observó hematuria durante la toma de muestras (2/54). En el grupo C la anamnesis reveló que el 4% de los animales habían tenido hematuria previa (3/74).

#### Conformación corporal

La media de conformación corporal (medido de 1 a 5) en el grupo A1 fue de  $1,71 \pm 0,37$ . El 42% de los animales (28/66) fueron considerados de categoría 1 (1–1,5), el 50% (33/66) de categoría 2 ( $>1,5 - 2,25$ ) y el 7% (5/66) de categoría 3 (2,25–3). La media de condición corporal del grupo B era de  $1,98 \pm 0,42$ . El 16% de los animales (9/54) se asignaron a la categoría 1, el 61% (35/54) a la categoría 2 y el 23% (16/54) a la categoría 3.



La media de conformación corporal en el grupo C era de  $1,89 \pm 0,31$ . El 11% de los animales (8/74) fueron considerados de categoría 1, el 75% (56/74) de categoría 2 y el 14% (16/74) de categoría 3.

### **Exploración clínica**

La temperatura rectal estuvo dentro de los rangos fisiológicos con una media de  $38,8 \pm 0,5$  °C en todos los grupos estudiados. La mucosa vulvar en el grupo A fue normal en el 70% de los casos (45/64) y ligeramente ictérica en el 3% de los casos (2/64). En el grupo B el 80% (43/54) de los animales presentaron mucosas normales, el 19% (10/54) mucosas anémicas y el 2% (1/54) con mucosas ictéricas. En el grupo C el 85% (63/74) de los animales presentaron mucosas normales, el 14% (10/74) mucosas anémicas y el 1% (1/74) mucosas levemente ictéricas. El examen físico no reveló ninguna otra alteración relevante en las exploraciones realizadas.

## **B. Patología clínica**

La mayoría de los resultados de los análisis de sangre y orina de las vacas control estaban dentro de los valores normales de referencia comparados a los parámetros analíticos publicados en ganado bovino (Maxie y Jubb 2007) con excepción de MCH, TTP y los valores de  $\alpha$ -globulina. En estos últimos parámetros los valores de las vacas control fueron considerados normales comparándolos con los de los grupos A1, A2, B, y C. Los valores de referencia de los parámetros estudiados se detallan en las tablas 3–5.

## **C. Hematología y pruebas de coagulación**

Los resultados están descritos en las tablas 3, 4 y 5.

### **Serie roja**

El hematocrito era bajo sólo en el 11% de los animales en el grupo A1 y de normal a bajo en el 25% del grupo A1, 7% del grupo A2, 2% del grupo B y 22% del grupo C (grafico 1).

Los valores de hemoglobina de los distintos grupos se exponen en el grafico 2.

Los valores medios de MCV, MCH y MCHC eran normales en todos los casos.

### **Leucocitos**

Se encontró leucopenia en un 9% del ganado del grupo A1, 8% en el grupo A2, 12% en el grupo B y 5% de los animales del grupo C.

Así mismo, existió linfopenia en un 65% de los animales del grupo A1, un 15% en el grupo A2, un 28% en el grupo B y un 9% en el grupo C. A pesar de ello, se detectó monocitosis en el 54% de los individuos del grupo A1, un 31% en el grupo A2, un 38% en el grupo B y un 28% en el grupo C. Se encontró trombocitopenia en un 80% en el grupo A1, en un 38% en el grupo A2, en un 90% en el grupo B y en un 9% en el grupo grupo C (grafico 3, 4, 5 y 6).

**Tabla 3. Datos analíticos de la serie roja en los grupos estudiados.**

Parámetros	Categorías*	Grupo Control (n=10)	Grupo A1 (n=54)	Grupo A2 (n=13)	Grupo B (n=42)	Grupo C (n=74)
<b>Hematocrito (%)</b>						
Media ± DE		37,91±4,10	29,63±5,56	38,60±4,31	36,47±3,97	33,84±3,40
Bajo	≤25		11%(n=6)	0	0	1% (n=1)
Bajo-normal	>25-30		25%(n=13)	8%(n=1)	2%(n=1)	15% (n=11)
Normal	>30		89%(n=47)	92%(n=12)	98%(n=41)	84% (n=62)
<b>Eritrocitos (x 10<sup>6</sup>/μL)</b>						
Media ± DE		7,10±1,16	5,88±1,24	10,26±1,70	6,65 ± 1,09	6,65±0,86
Bajo	≤4,34		9%(n=5)	0	0	0
Bajo-normal	>4,34-6		36%(n=19)	0	31%(n=13)	22% (n=16)
Normal	>6		91%(n=48)	100%(n=13)	69%(n=29)	78% (n=58)
<b>Hemoglobina (g/L)</b>						
Media ± DE		10,50±2,28	10,50±2,28	12,99±1,41	12,38±1,29	11,02±1,13
Bajo	≤7,55		9% (n=5)	0	0	0
Normal	>7,55		91%(n=49)	100%(n=13)	100%(n=42)	100% (n=74)
<b>MCV (μm<sup>3</sup>)</b>						
Media ± DE	>40-60	53,96±4,97	50,91±4,11	38,23±5,72	55,61±6,28	51,27±4,47
<b>HCM (pg)</b>						
Media ± DE	>11-21	16,80±0,38	17,78±1,44	12,83±1,68	18,88±2,11	16,67±1,30
<b>MCHC (g/L)</b>						
Media ± DE	>300-360	330,0±9,6	349,2±7,8	336,4±7,8	339,4±7,1	325,7±12,0

Categorías\*: Categorización de las variables numéricas según los valores normales del grupo control y los valores de referencia en el ganado vacuno (Maxie y Jubb 2007).

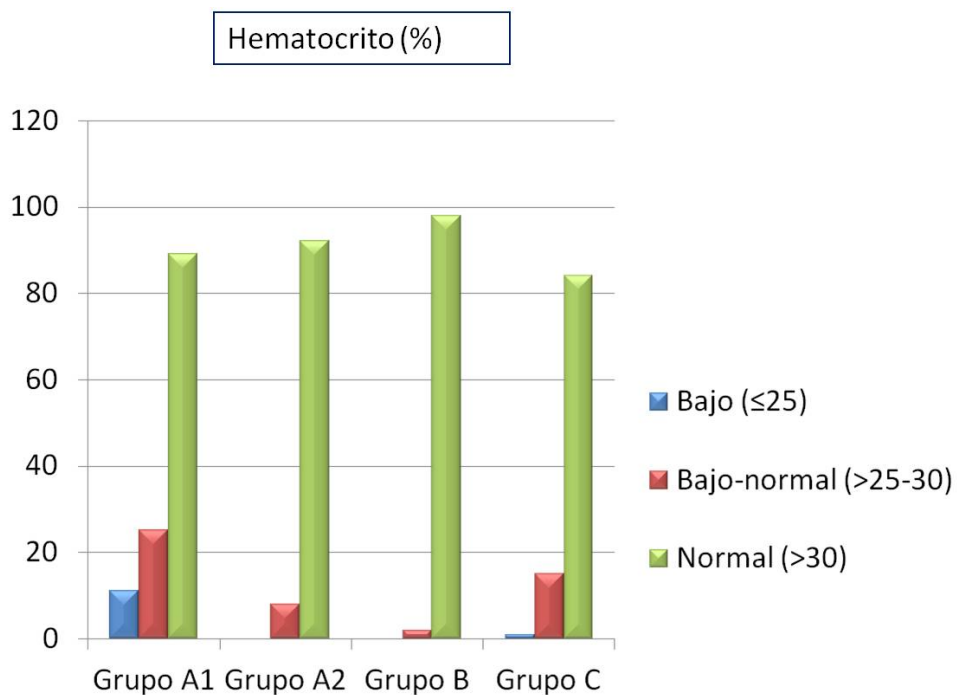


Gráfico 1. Hematocrito en los grupos estudiados.

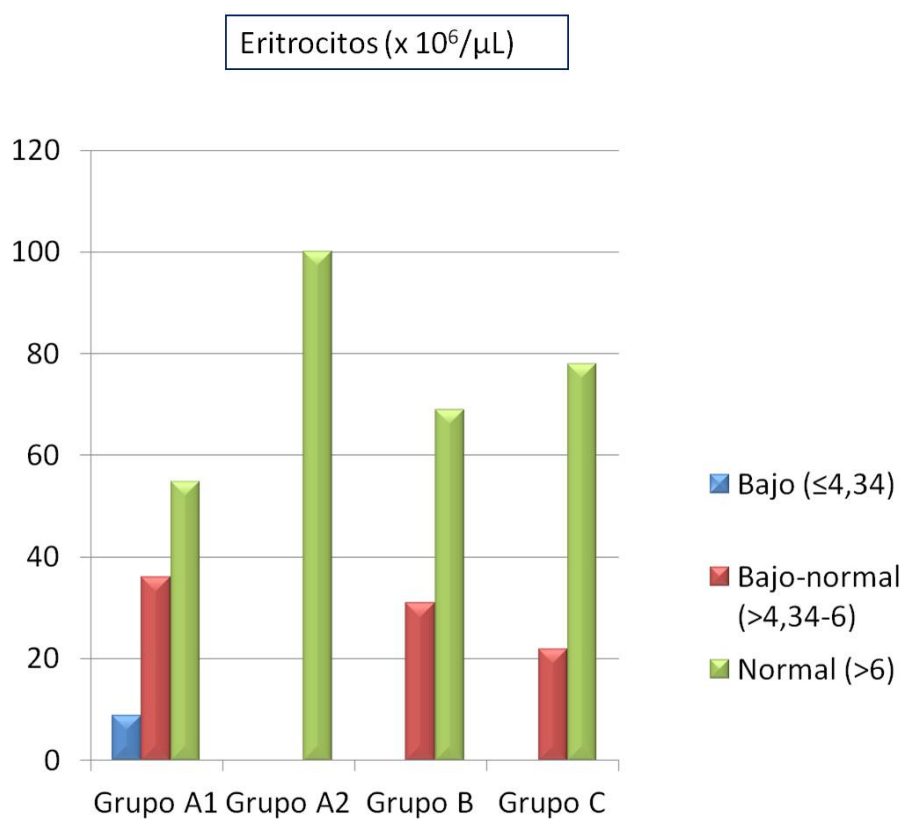


Gráfico 2. Eritrocitos en los grupos estudiados.

Tabla 4. Datos analíticos del leucograma en los grupos estudiados.

Parámetros	Categorías*	Grupo Control (n=10)	Grupo A1 (n=54)	Grupo A2 (n=13)	Grupo B (n=42)	Grupo C (n=74)
<b>Leucocitos</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )						
Media $\pm$ DE		6,51 $\pm$ 1,12	5,81 $\pm$ 1,93	9,86 $\pm$ 2,78	6,66 $\pm$ 2,87	7,97 $\pm$ 2,54
Bajo	$\leq 3,55$		9% (n=5)	8% (n=1)	12% (n=5)	5% (n=4)
Bajo-normal	$> 3,55-5,55$		35% (n=19)	0	31% (n=13)	9% (n=7)
Normal	$> 5,55-12$		56% (n=30)	92% (n=12)	57% (n=24)	58% (n=43)
Alto	$> 12$		0	0	0	9% (n=7)
<b>Cayado</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )						
Media $\pm$ DE		0	0,05 $\pm$ 0,37	0	0	0
Normal	$> 0-0,12$		98% (n=53)	100% (n=13)	100% (n=42)	1% (n=1)
Alto	$> 0,12$		2% (n=1)	0	0	99% (n=73)
<b>Neutrofilos</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )						
Media $\pm$ DE		1,62 $\pm$ 0,40	2,00 $\pm$ 0,75	2,69 $\pm$ 1,18	1,22 $\pm$ 0,54	2,44 $\pm$ 1,35
Bajo	$\leq 0,6$		4% (n=2)	8% (n=1)	7% (n=3)	11% (n=8)
Bajo-normal	$> 0,6-1,5$		24% (n=13)	8% (n=1)	67% (n=28)	11% (n=8)
Normal	$> 1,5-4$		72% (n=39)	85% (n=11)	26% (n=11)	72% (n=53)
Alto	$> 4$		0	0	0	7% (n=5)
<b>Eosinofilos</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )						
Media $\pm$ DE		0,16 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,34	0,57 $\pm$ 0,70	0,55 $\pm$ 0,51	0,71 $\pm$ 0,62
Normal	$> 0-2,4$		100% (n=54)	100% (n=13)	100% (n=42)	100% (n=74)

Categorías\*: Categorización de las variables numéricas según los valores normales del grupo control y los valores de referencia en el ganado vacuno (Maxie y Jubb 2007).

**Tabla 4 (cont.). Datos analíticos del leucograma en los grupos estudiados.**

Parámetros	Categorías*	Grupo Control (n=10)	Grupo A1 (n=54)	Grupo A2 (n=13)	Grupo B (n=42)	Grupo C (n=74)
<b>Basofilos</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )						
Media $\pm$ DE		0	0,003 $\pm$ 0,01	0	0	0,008 $\pm$ 0,02
Normal	>0-0,2		100% (n=54)	100% (n=13)	100% (n=42)	100% (n=74)
<b>Linfocitos</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )						
Media $\pm$ DE		4,02 $\pm$ 0,56	2,18 $\pm$ 1,06	6 $\pm$ 2,46	4,10 $\pm$ 2,14	9% (n=7)
Bajo	$\leq 2,5$		65% (n=35)	15% (n=2)	29% (n=12)	18% (n=13)
Bajo-normal	>2,5-3,5		22% (n=12)	0	17% (n=7)	70% (n=52)
Normal	>3,5		13% (n=7)	85% (n=11)	55% (n=23)	3% (n=2)
<b>Monocitos</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )						
Media $\pm$ DE		0,71 $\pm$ 0,12	1,02 $\pm$ 0,58	0,73 $\pm$ 0,23	0,82 $\pm$ 0,49	0,49 $\pm$ 0,27
Normal	$\leq 0,85$		46% (n=25)	70% (n=9)	62% (n=26)	91% (n=67)
Alto	>0,85-1,25		26% (n=14)	31% (n=4)	21% (n=9)	9% (n=7)
Muy alto	>1,25		27% (n=15)	0	17% (n=7)	0

Categorías\*: Categorización de las variables numéricas según los valores normales del grupo control y los valores de referencia en el ganado vacuno (Maxie y Jubb 2007).

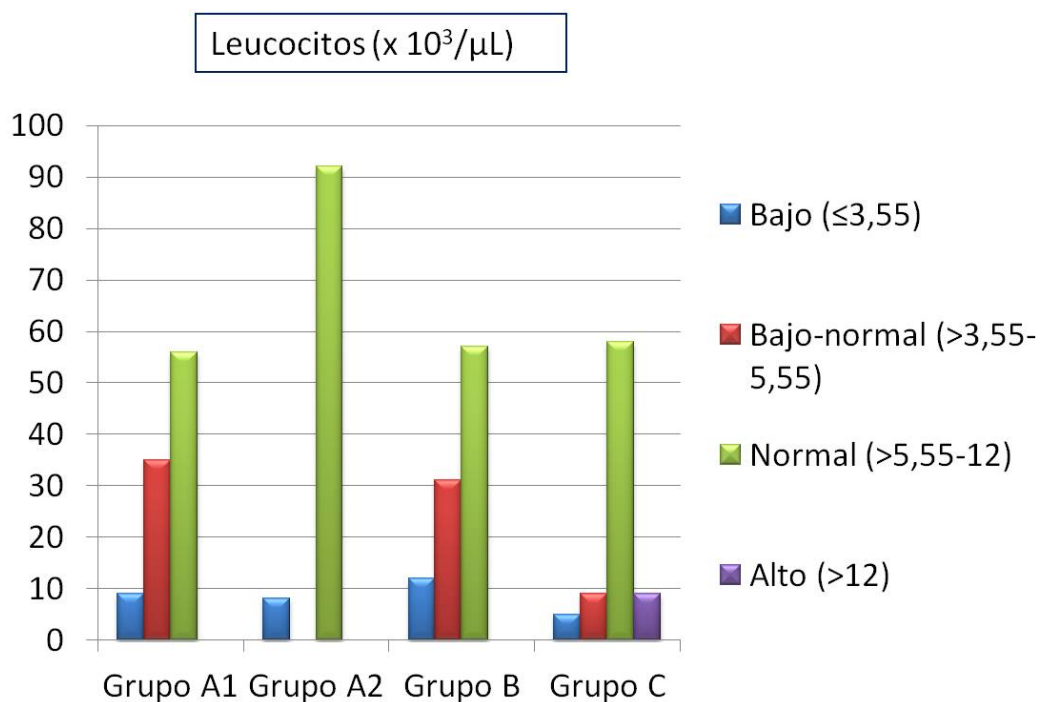


Gráfico 3. Leucocitos en los grupos estudiados.

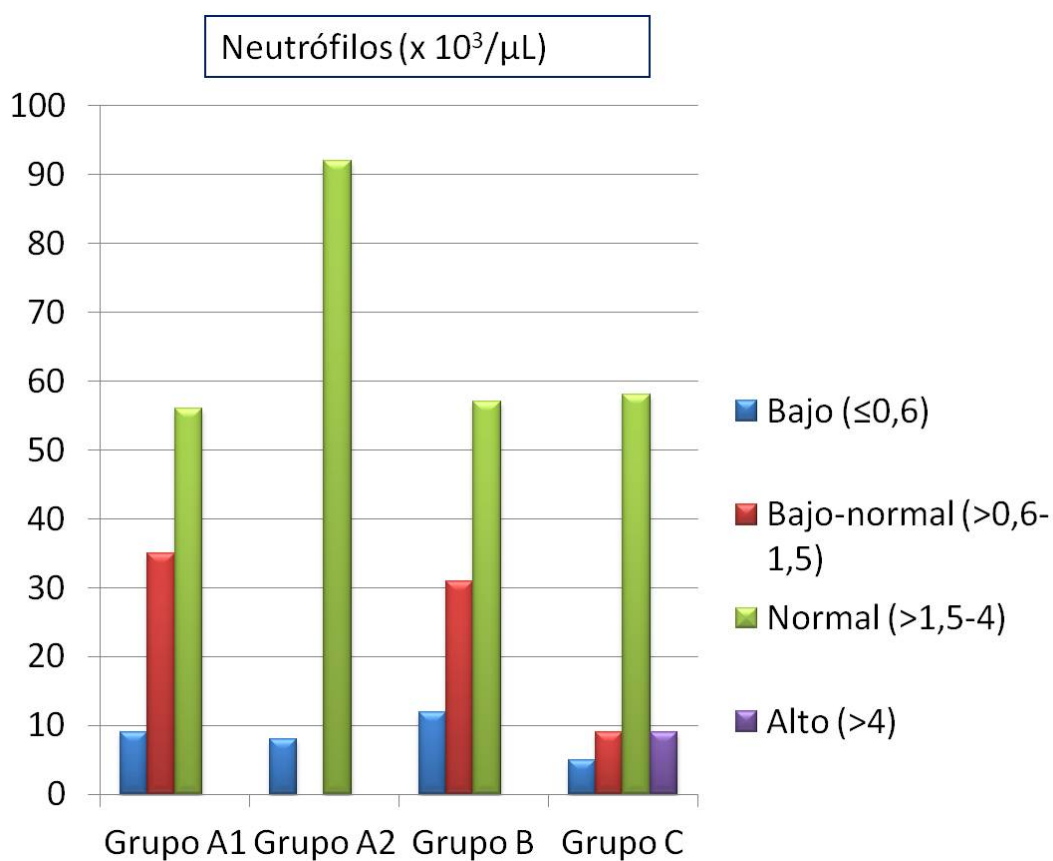


Gráfico 4. Neutrófilos en los grupos estudiados.

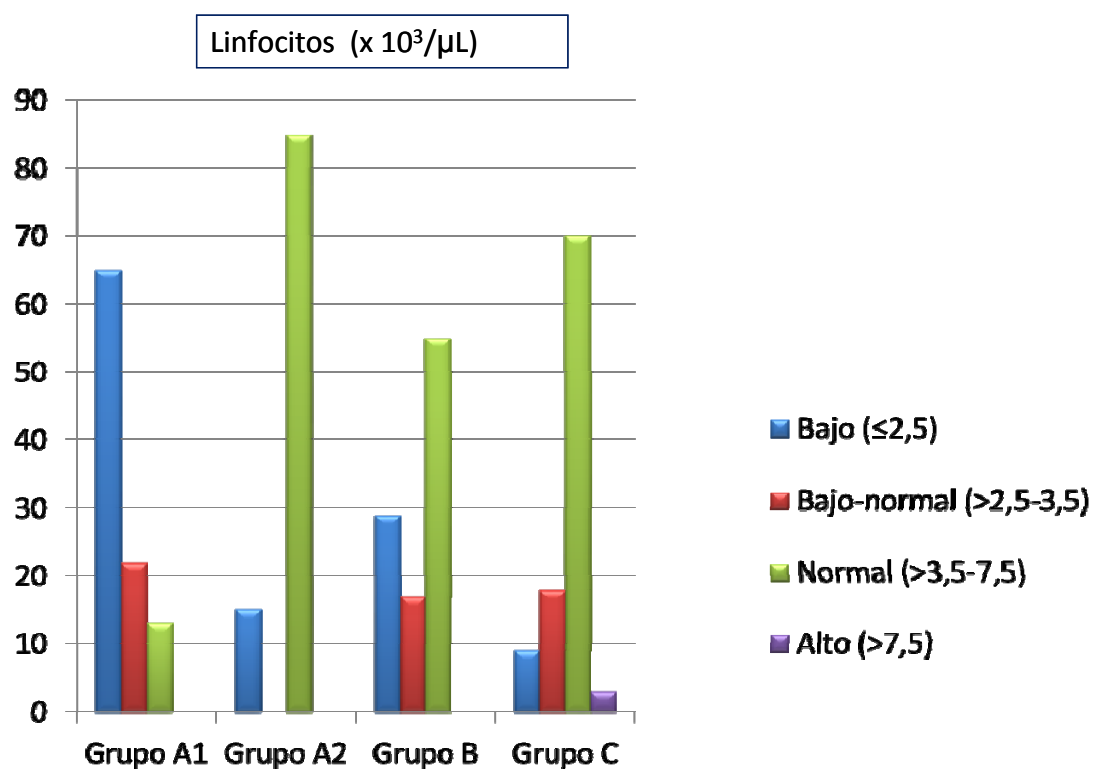


Gráfico 5. Linfocitos en los grupos estudiados.

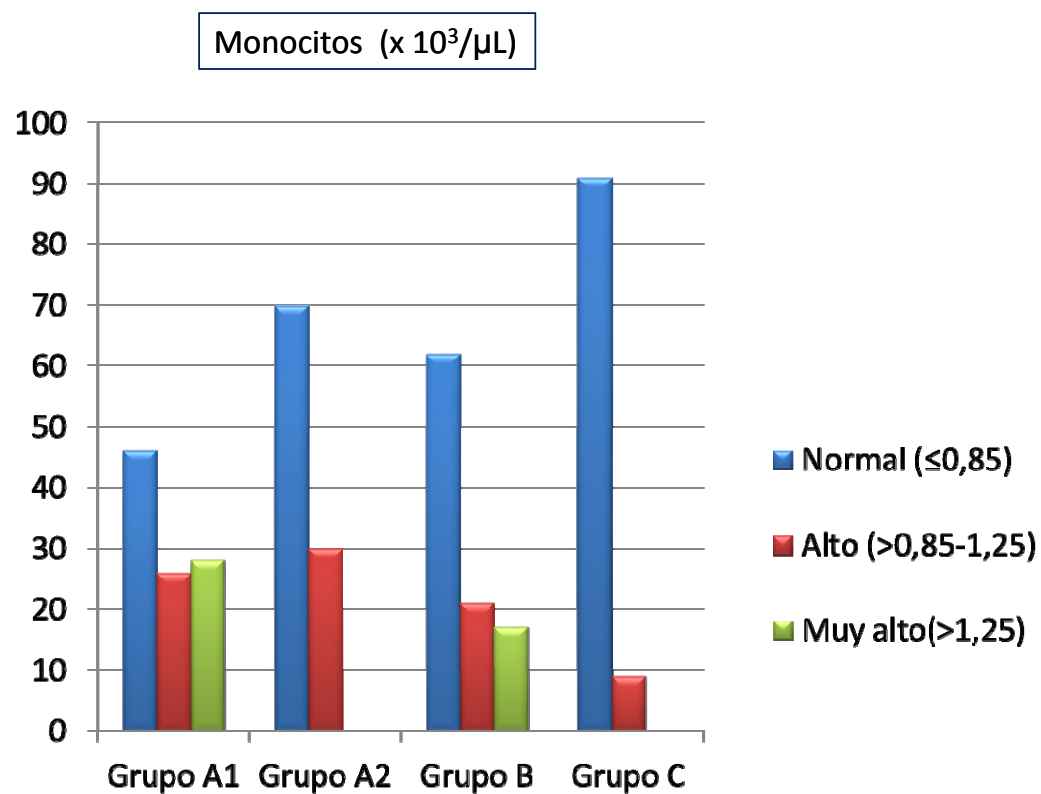


Gráfico 6. Monocitos en los grupos estudiados.



**Tabla 5. Datos analíticos de los parámetros hemáticos relacionados con la coagulación en los grupos estudiados.**

Parámetros	Categorías*	Grupo Control (n=10)	Grupo A1 (n=54)	Grupo A2 (n=13)	Grupo B (n=42)	Grupo C (n=74) <sup>1</sup>
<b>Trombocitos</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )						
Media $\pm$ DE		373 $\pm$ 120	194 $\pm$ 116	328 $\pm$ 157	177 $\pm$ 106	253 $\pm$ 84
Muy bajos	>0-150		35%(n=19)	15%(n=2)	46%(n=19)	9% (n=5)
Bajos	>150-300		44%(n=24)	23%(n=3)	43%(n=18)	21% (n=12)
Normal	>300		20%(n=11)	62%(n=8)	10%(n=4)	70% (n=40)
<b>Fibrinogeno</b> (g/L)						
Media $\pm$ DE		3,10 $\pm$ 0,33	2,87 $\pm$ 6,37	No	No	No
Bajo	<300		61%(n=38)	No	No	No
Normal	$\geq$ 300		39%(n=24)	No	No	No
<b>TP</b> (sec)						
Media $\pm$ DE		24,5 $\pm$ 2,3	33,3 $\pm$ 5,8	No	No	No
Normal	>22-55		100%(n=62)	No	No	No
<b>TTP</b> (sec)¶						
Media $\pm$ DE		25,7 $\pm$ 4,6	26,2 $\pm$ 5,2	No	No	No
Normal	>22-64		100%(n=62)	No	No	No

Categorías\*: Categorización de las variables numéricas según los valores normales del grupo control y los valores de referencia en el ganado vacuno (Maxie y Jubb 2007).

<sup>1</sup> La analítica correspondiente no se realizó en 19 animales por estar las muestras hemolizadas

### **Pruebas de coagulación**

El perfil de coagulación del grupo A1 reveló que los tiempos activados parciales de tromboplastina (TTPA) y protrombina (TP) no estaban alterados. En el estudio, los niveles de fibrinógeno plasmático eran bajos en el 61% del grupo A1 y normales en el resto de grupos estudiados (tabla 5).

### **Perfil bioquímico**

Se realizó bioquímica sanguínea en los grupos A1, A2 y B. Los valores de glucosa sérica, creatinina, urea, nitrógeno, calcio, fósforo, aspartato amino transferasa y gamma glutamil transferasa (GGT) estuvieron dentro de los valores de referencia en la mayoría (>95%) de los animales de los grupos estudiados. También el nivel de hierro sérico fue normal en la mayoría de los animales (78% grupo A1, 100% grupo A2, 88% grupo B).y se encontró bajo en un pequeño porcentaje (21% grupo A1).

Existió hipoalbuminemia relevante en el 39% de los animales del grupo A1 y en el 18% del grupo B.

La relación albumina/globulina fue baja ( $\leq 0,8$  g/L) en la mayoría de los animales de los grupos A1 y B (62% y 76% respectivamente). Cuando se estudiaron por separado las fracciones de las globulinas se observó que las  $\alpha$ -globulinas estuvieron dentro del rango de referencia y las  $\beta$ -globulinas estuvieron bajas ( $\leq 0,8$  g/L; 66%, grupo A1; 77%, grupo A2) o normales (rango 0,8-1,12 g/L) en el (63% grupo B). Por el contrario, las gamma-globulinas estuvieron aumentadas ( $>2,23$  g/L) en un porcentaje relevante

de los animales (66%, grupo A1; 86%; grupo B; 31%, grupo A2). Los valores de proteínas séricas en los grupos de animales se detallan en la tabla 6.

**Tabla 6. Datos analíticos de las proteínas séricas en los grupos estudiados.**

Parámetros	Categoría*	Grupo Control (n=10)	Grupo A1 (n=54)	Grupo A2 (n=13)	Grupo B (n=42)
<b>Proteínas Totales (q/L)</b>					
Media ± DE		75,5±3,5	73,0±9,4	71,8±3,7	78,5±5,7
Baja	≤6,5		9%(n=6)	0	0
Normal	>6,5-7,8		67%(n=43)	100%	51%(n=26)
Alta	>7,8		23%(n=15)	0	49%(n=25)
<b>Albuminas (q/L)</b>					
Media ± DE		31,6±2,4	31,5±6,3	36,5±4,4	32,3±2,9
Baja	≤3		39%(n=25)	0	18%(n=9)
Normal	>3		61%(n=39)	100%	82%(n=42)
<b>Relación A/G<sup>1</sup></b>					
Media ± DE		0,77±0,21	0,77±0,21	1,08±0,30	0,71±0,12
Baja	≤0,8		63%(n=40)	8%(n=1)	77%(n=39)
Normal	>0,8-0,99		21%(n=13)	46%(n=6)	22%(n=11)
Alta	>0,99		16%(n=10)	46%(n=6)	2%(n=1)
<b>α-Globulinas (q/L)</b>					
Media ± DE		10,4±0,7	9,2±1,0	10,3±1,0	9,0±1,2
Normal	>0,75-1,2		100%	100%	100%
<b>β-Globulinas (q/L)</b>					
Media ± DE		10,5±2,0	7,7±2,8	6,6±1,3	10,3±3,1
Baja	≤0,8		66%(n=42)	80%(n=10)	14%(n=7)
Normal	>0,8-1,12		27%(n=17)	23%(n=3)	63%(n=32)
Alta	>1,12		8%(n=64)	0	24%(n=12)
<b>γ-Globulinas (q/L)</b>					
Media ± DE		10,9±0,2	7,7±2,1	18,2±4,4	26,7±4,9
Baja	≤1,69		8%(n=64)	46%(n=6)	2%(n=1)
Normal	>1,69-2,23		27%(n=17)	23%(n=3)	12%(n=6)
Alta	>2,23		66%(n=42)	31%(n=4)	86%(n=44)

Categorías\*: Categorización de las variables numéricas según los valores normales del grupo control y los valores de referencia en el ganado vacuno (Maxie y Jubb 2007).

## **D. Urianálisis**

Todos los animales de los grupos estudiados (A1, A2 y B) tenían valores de pH normales en orina y ausencia de glucosuria. En la mayoría de las muestras no había leucocitos (grupo A1, 93% 55/59; grupo B 95% 2/43), nitritos (grupo A1, 96% 57/59; grupo B, 97% 42/43), cuerpos cetonicos (grupo A1, 89%, 53/59; grupo B, 72%, 31/43), o bilirrubina (grupo A1 91%, 54/59; grupo B 95%, 41/43).

### **Proteinuria**

En el grupo A1 se detectó proteinuria moderada en el 40% de los animales (24/59) y severa en el 20% (12/59). En el grupo B hubo trazas de proteinuria en el 27% (12/43) de los animales; un 60% (26/43) presentaban proteinuria baja y un 11% (5/43) tenía proteinuria moderada.

### **Microhematuria**

Se utilizaron tiras de orina para medir la microhematuria en el análisis de campo. En el grupo A1, un 33% de los casos (20/59) no presentaban microhematuria, existían trazas en el 10% (6/59), se detectó sangre 1+ en el 8% (5/59), sangre 2+ en el 1% (7/59) y sangre 3+ en el 35% (21/59). En el grupo B los resultados fueron negativos en el 53% (23/43) de los casos, un 11% (5/43) tuvo trazas, un 9% (4/43) sangre 1+, un 16 (7/43) sangre 2+ y en un 9% de los animales (4/43) sangre 3+.

## Sedimento urinario

Se realizaron dos análisis separados del mismo sedimento urinario: análisis 1 (laboratorio del HCV) y análisis 2 (laboratorio privado de análisis).

**Análisis 1.** El análisis del sedimento de orina realizado en el grupo A1 reveló microhematuria negativa ( $< 6$  eritrocitos por campo), en un 51% (29/56), positiva (6–20 eritrocitos por campo) en un 19% (11/56), moderada (20–100 eritrocitos por campo) en un 12% (87/56) y severa ( $>100$  eritrocitos por campo) en un 16% (9/56) de los animales. No existió descamación epitelial en el sedimento en el 17% (10/56) de los animales, la descamación fue ocasional en el 57% (32/56), moderada en el 19% (11/56) y abundante en el 5% (3/56) de los casos (tabla 8).

**Análisis 2.** El examen microscópico del sedimento urinario de las muestras remitidas al laboratorio, reveló la presencia de hematuria en un 19% (grupo A1) y un 17% (grupo B) de las vacas. Un 51% de las vacas del grupo A1 y un 39% del grupo B presentaban células desescamadas procedentes del epitelio de transición de las vías urinarias en valores superiores a los considerados normales para la especie (1-2 por campo, 40X). Además, se observaron respectivamente, un 40% y un 17% de citologías que presentaban nidos celulares, generalmente asociados al desarrollo de procesos hiperplásicos y proliferativos en el epitelio de las vías urinarias. El estudio citológico con técnicas convencionales no permitió diagnosticar con precisión el tipo de proceso hiperplásico/inflamatorio.

La presencia de bacterias fue de un 8% en el grupo A1 y un 17% en el grupo B.

**Tabla 7. Urianálisis mediante tiras de orina en los grupos A1 y B.**

Parámetros	Grupo A1 (n=59)	Grupo B (n=43)
<b>Leucocitos</b>		
No	93% (n=55)	95% (n=41)
Si	7% (n=4)	5% (n=2)
<b>Nitritos</b>		
No	97% (n=57)	98% (n=42)
Si	3% (n=2)	2% (n=1)
<b>Cuerpos cetonicos</b>		
No	90% (n=53)	72% (n=31)
Si	10% (n=10)	28% (n=12)
<b>Bilirubina</b>		
No	92% (n=54)	95% (n=41)
Si	8% (n=5)	5% (n=2)
<b>Proteínas</b>		
No	0	0
Trazas	8% (n=5)	28% (n=12)
1+	31% (n=18)	60% (n=26)
2+	41% (n=24)	12% (n=5)
3+	20% (n=12)	0
<b>Hematuria</b>		
Ausencia	34% (n=20)	54% (n=23)
Trazas	10% (n=6)	12% (n=5)
Sangre 1+	8% (n=5)	9% (n=4)
Sangre 2+	12% (n=7)	16% (n=7)
Sangre 3+	36% (n=21)	9% (n=4)

**Tabla 8. Análisis del sedimento urinario en el grupo A1.**

Parámetros	Grupo A1 (n=56)
<b>Microhematuria</b>	
Negativa	52% (n=29)
Positiva	20% (n=11)
Moderada	12% (n=7)
Severa	16% (n=9)
<b>Células epiteliales descamadas</b>	
Negativa	18% (n=10)
Positiva	57% (n=32)
Moderada	20% (n=11)
Severa	5% (n=3)

## **E. Estudio Multivariante: análisis estadísticos de variables múltiples. tipología.**

Los análisis estadísticos multivariantes realizados en cada grupo de estudio (A1, A2, B y C) permitieron clasificar animales con características analíticas comunes, estadísticamente significativas. Dado que en estos análisis emplean sólo casos completos (todas las variables con datos conocidos), el número de casos en el grupo A1 descendió a 47, en el A2 se mantuvo en 13, en el grupo B bajó a 54 y se mantuvo en 74 en el grupo C.

**Grupo A1.** El análisis estadístico estableció 3 clases o subgrupos de animales con características similares en las variables estudiadas (gráfico 7).

Grupo A1, clase 1. En la clase 1 el procedimiento estadístico incluyó 22 animales con una edad media de 6,8 años ( $p=0,005$ ) que tuvieron valores normales en muchas de las variables estudiadas: sin antecedentes de hematuria, ausencia de hematuria actual ( $p=0,008$ ), niveles normales de eritrocitos ( $p=0,009$ ), hematocrito ( $p=0,001$ ), hemoglobina ( $p=0,001$ ), leucocitos ( $p=0,000$ ), neutrófilos ( $p=0,008$ ), linfocitos ( $p=0,018$ ), albuminemia ( $p=0,000$ ), relación albumina/globulina ( $p=0,000$ ), microhematuria negativa en sedimento (recuento) ( $p=0,042$ ), ausencia de leucocitos en orina ( $p=0,016$ ) y bilirrubina en orina negativa ( $p=0,011$ ).

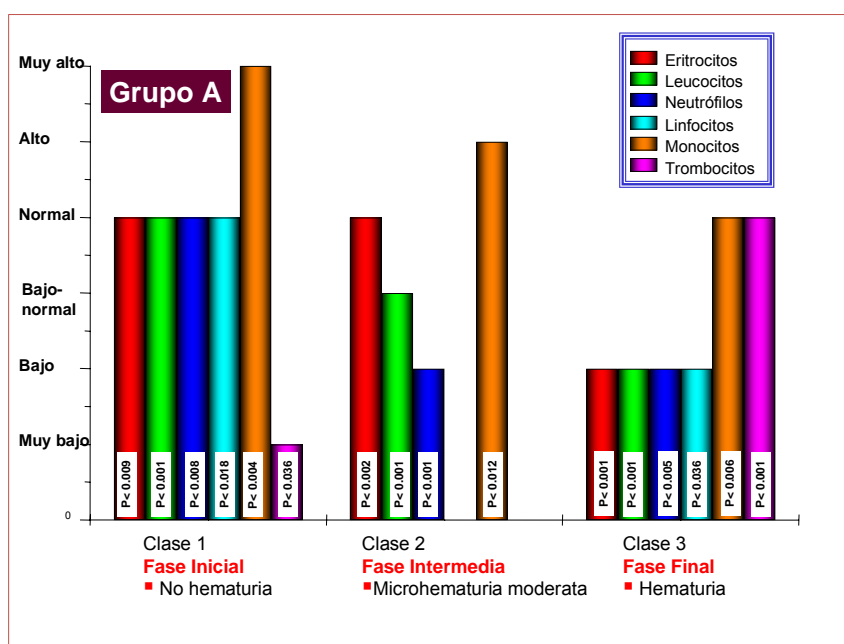
Los animales incluidos en esta clase presentaron algunas alteraciones, como trazas de sangre en orina (medido con tiras de orina) ( $p=0,000$ ), una marcada trombocitopenia ( $p=0,036$ ) y algunas células de transi-



ción ocasionales en el sedimento ( $p=0,027$ ). Este grupo se caracterizó además por una marcada monocitosis ( $p=0,004$ ).

Grupo A1, clase 2. En la clase 2 se agruparon 26 animales con 9,1 años de media (valor no significativo) y presentaron valores normales de eritrocitos ( $p=0,002$ ), hematocrito ( $p=0,001$ ), hemoglobina ( $p=0,002$ ), niveles bajos-normales de leucocitos ( $p=0,000$ ), bilirrubina negativa ( $p=0,003$ ), leucocitos negativos ( $p=0,005$ ), células de transición en sedimento ( $p=0,010$ ) y alteraciones bajas, moderadas o severas en numerosas variables: linfopenia ( $p=0,000$ ), moderada monocitosis ( $p=0,012$ ), hipoalbuminemia ( $p=0,022$ ), hipergammaglobulinemia ( $p=0,003$ ), relación albumina/globulina baja ( $p=0,000$ ), moderada microhematuria-recuento, ( $p=0,045$ ).

Grupo A1, clase 3. En la clase 3 se incluyeron 6 animales con una edad media de 12,8 años ( $p=0,008$ ) con mucosas pálidas ( $p=0,004$ ), hematuria ( $p=0,011$ ) y numerosos parámetros alterados: nivel de eritrocitos bajo ( $p=0,000$ ), hematocrito bajo ( $p=0,000$ ), hemoglobina baja ( $p=0,000$ ), leucopenia ( $p=0,000$ ), neutropenia ( $p=0,005$ ), linfopenia ( $p=0,036$ ), hipoproteinemia ( $p=0,004$ ), hipoalbuminemia ( $p=0,006$ ), hipogammaglobulinemia ( $p=0,002$ ), microhematuria mediante tira de orina 3+ ( $p=0,002$ ) y microhematuria severa mediante recuento ( $p=0,0016$ ), leucocitos en orina ( $p=0,006$ ) y bilirrubina en orina positivo ( $p=0,000$ ). Valores normales de monocitos ( $p=0,006$ ) y plaquetas ( $p=0,029$ ).



**Gráfico 7. Datos analíticos del grupo A1.**

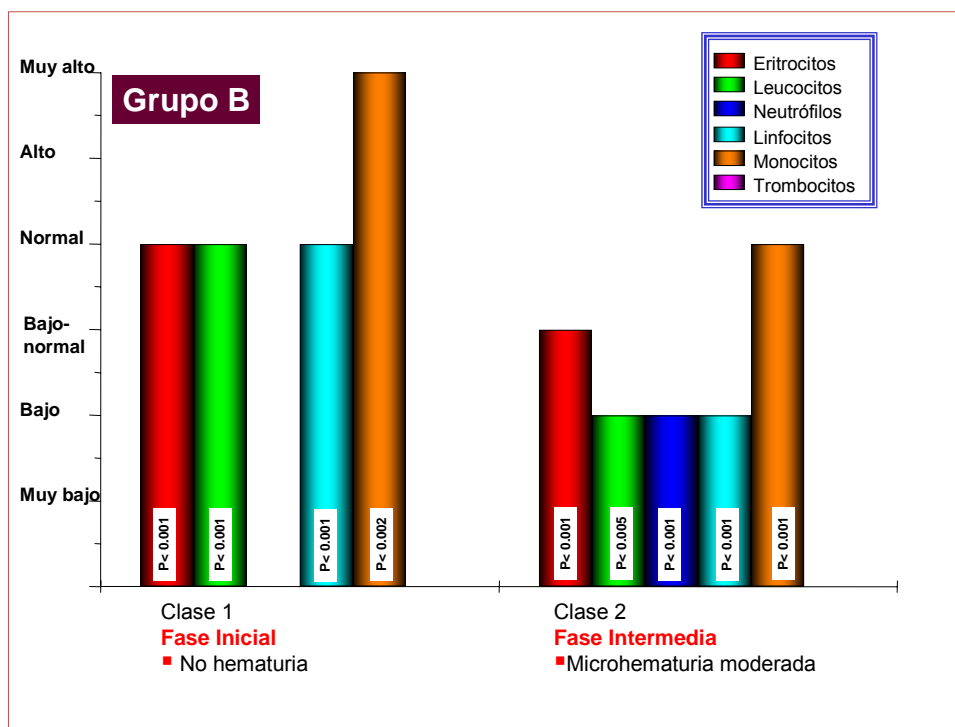
**Grupo B.** Los análisis de variables múltiples dividieron al grupo en dos clases de animales con características analíticas similares (gráfico 8).

Grupo B, clase 1. Integrado por 23 animales con valores normales de leucocitos ( $p < 0,001$ ), linfocitos ( $p < 0,001$ ), eritrocitos ( $p < 0,001$ ), hematocrito ( $p = 0,001$ ), hemoglobina ( $p = 0,002$ ) y una marcada monocitosis ( $p = 0,002$ ).

Grupo B, clase 2. Integrado por 19 animales con niveles bajos-normales ( $p < 0,001$ ) o bajos ( $p = 0,005$ ) de leucocitos, nivel bajo ( $p < 0,001$ ) o bajo-normal ( $p = 0,008$ ) de linfocitos, nivel bajo-normal de eritrocitos ( $p < 0,001$ ), neutrófilos con niveles, bajo o bajo-normal ( $p = 0,008$ ), niveles normales de hemoglobina ( $p = 0,009$ ) y un recuento normal de monocitos ( $p < 0,001$ ).

Aunque no existió asociación estadísticamente significativa con la presencia de eritrocitos en orina (trazas 1+, 2+, 3+) en ninguna de las dos clases, el 59% de los animales de las clase 1 tuvo una presencia

menor de eritrocitos (1+ ó 2+) que los animales en la clase 2. Todos los animales con eritrocitos 3+ fueron incluidos en la clase 2



**Gráfico 8. Datos analíticos del grupo B.**

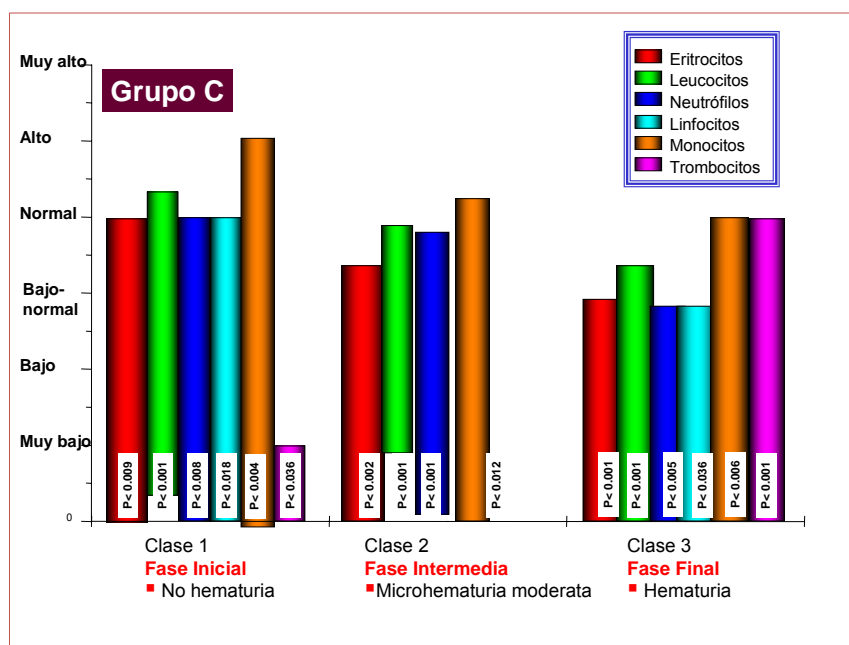
## Grupo C

Los resultados del grupo C compuesto por un total de 74 animales están resumidos en el gráfico 9 y descritos en las siguientes tablas (Tabla 9, 10 y 11).

Grupo C clase 1 Compuesto por 19 animales con una media de edad de 4,7 años que tenían valores normales significativos en muchas de las variables estudiadas: hematuria negativa ( $p=0,00$ ), con valores de hematíes ( $p=0,00$ ), linfocitos ( $p=0,00$ ), hematocrito normales ( $p=0,00$ ) y monocitosis moderada ( $p=0,00$ ).

Grupo C clase 2. Integrado por 22 animales con una media de edad de 8,5 años y con valores de neutrofilos altos ( $p=0,00$ ), leucocitos en valores normales ( $p=0,002$ ), hematíes con valores de normales a bajos ( $p=0,002$ ), hematocrito normal bajo ( $p=0,00$ ) y monocitos en cantidad normal.

Grupo C clase 3. Integrado por 33 animales presentó una media de edad de 10,5 años y un nivel bajo de linfocitos ( $p=0,00$ ), neutrofilos ( $p=0,00$ ) y leucocitos (bajo o medio-bajo) ( $p=0,00$ ) con niveles normales de monocitos.



**Gráfico 9. Datos analíticos del grupo C.**

**Tabla 9. Datos analíticos de la serie roja en el grupo C, clases 1, 2 y 3.**

	Categoría*	Grupo Control (n=10)	Grupo C			
			(n=74)	CLASE 1 (n=19)	CLASE 2 (n=22)	CLASE 3 (n=33)
<b>Eritrocitos</b> (x 10 <sup>6</sup> /μL)						
	Media ± DE	7,10 ± 1,16	6,65±0,86	7,57±0,69	6,21±0,48	6,40±0,75
	Baja-normal	>4,34-6		5% (n=1)	32% (n=7)	24% (n=8)
	Normal	>6		95% (n=18)	68% (n=15)	76% (n=25)
<b>Hematocrito</b> (%)						
	Media ± DE	38 ± 4	34±3	37±3	31±2	34±3
	Baja	<25		0	5% (n=1)	0
	Baja-normal	>25-30		0	27% (n=6)	15% (n=5)
	Normal	>30		100% (n=19)	68% (n=15)	85% (n=28)
<b>MCV</b> (μm <sup>3</sup> )						
	Media ± DE	53,96±4,97	51,27±4,47	48,94±5,01	50,62±2,18	53,05±4,54
<b>HCM</b> (pg)						
	Media ± DE	16,80±0,38	16,67±1,30	16,01±1,34	16,56±0,69	17,13±1,40
<b>MCHC</b> (g/L)						
	Media ± DE	330,0±9,6	325,7±12,0	328,2±14,6	327,2±8,8	323,3±11,9

Categorías\*: Categorización de las variables numéricas según los valores normales del grupo control y los valores de referencia en el ganado vacuno (Maxie y Jubb 2007).

**Tabla 10. Datos analíticos de la serie blanca en el grupo C, clases 1, 2 y 3.**

	Categoría*	Grupo Control (n=10)	Grupo C			
			(n=74)	CLASE 1	CLASE 2	CLASE 3
Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)						
Media ± DE		6,51±1,12	7,97±2,54	9,90±2,24	9,23±1,66	6,01±1,62
Bajo	≤3,55			8% (n=1)	0	9% (n=3)
Bajo-normal	>3,55-5,55			0	0	21% (n=7)
Normal	>5,55-12			74% (n=14)	91% (n=20)	70% (n=23)
Alto	>12			26% (n=5)	9% (n=2)	0
Neutrofilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)						
Media ± DE		1,62±0,40	2,44±1,35		3,64±1,06	1,68±0,89
Bajo	≤0,6			11 (n=2)	0	18% (n=6)
Bajo-normal	>0,6-1,5			5% (n=1)	0	21% (n=7)
Normal	>1,5-4			84% (n=16)	77% (n=17)	61% (n=20)
Alto	>4			0	23% (n=5)	0
Linfocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)						
Media ± DE		4,02±0,56	4,32±1,68	6,00±1,84		3,45±0,99
Bajo	≤2,5			0	5% (n=1)	18% (n=6)
Bajo-normal	>2,5-3,5			5% (n=1)	18% (n=4)	24% (n=8)
Normal	>3,5-7,5			84% (n=16)	77% (n=17)	58% (n=19)
Alto	>7,5			11% (n=2)	0	0
Monocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)						
Media ± DE		0,71±0,12	0,49±0,27	0,70±0,29		0,35±0,20
Normal	≤0,85			74% (n=14)	91% (n=20)	100% (n=33)
Alto	>0,85-1,25			26% (n=5)	9% (n=2)	0

Categorías\*: Categorización de las variables numéricas según los valores normales del grupo control y los valores de referencia en el ganado vacuno (Maxie y Jubb 2007).

**Tabla 11 Datos analíticos de la serie blanca en valor porcentual en el grupo C, clases 1, 2 y 3. Valores\*:** Valores normales en relación al grupo control.

Categoría*		Grupo Control (n=10)	Grupo C			
			(n=74)	CLASE 1 (n=19)	CLASE 2 (n=22)	CLASE 3 (n=33)
<b>Neutrofilos (%)</b>						
Media ± DE		31,09±10,31	29,50±12,51	23,80±11,51	39,18±8,21	26,33±11,79
Bajo	≤6			0	0	0
Bajo-normal	>6-15			16% (n=3)	0	21% (n=7)
Normal	>15-45			79% (n=15)	86% (n=19)	76% (n=25)
Alto	>45			5% (n=1)	14% (n=3)	3% (n=1)
<b>Linfocitos (%)</b>						
Media ± DE		52,43±15,02	54,93±15,23	61,05±14,21	44,96±9,24	58,06±15,79
Bajo	≤25			0	0	0
Bajo-normal	<25-35			16% (n=3)	0	21% (n=7)
Normal	>35-75			79% (n=15)	86% (n=19)	76% (n=25)
Alto	>75			5% (n=1)	14% (n=3)	3% (n=1)
<b>Monocitos (%)</b>						
Media ± DE		6,53±2,48	6,25±3,08	7,21±2,86	6,09±2,49	5,82±3,4
Normal	≤8			58% (n=11)	73% (n=16)	64% (n=21)
Alto	>8-12			42% (n=8)	27% (n=6)	33% (n=11)
Muy alto	>12			0	0	3% (n=1)

Categorías\*: Categorización de las variables numéricas según los valores normales del grupo control y los valores de referencia en el ganado vacuno (Maxie y Jubb 2007).

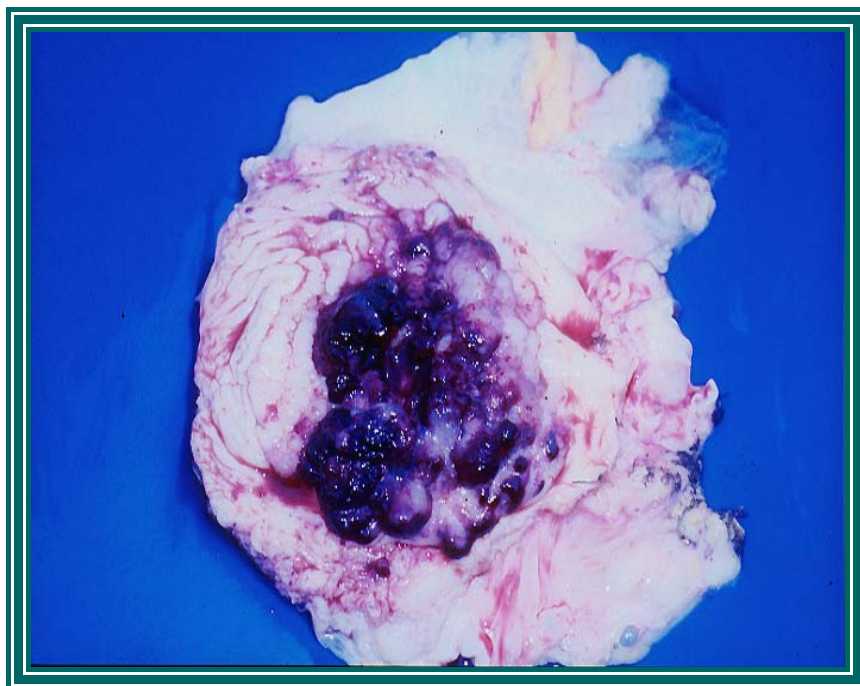
## **F. Hallazgos macroscópicos e histopatológicos.**

Las vacas con hematuria a las que se les realizó la necropsia (n=3, animales V1, V2, V3) de la explotación A, grupo A1 presentaron neoplasias en la vejiga de la orina con marcadas áreas hemorrágicas macroscópicas (ilustración 8 y 9). Histológicamente se correspondieron con tumores mixtos, en los que la parte epitelial era un carcinoma con células de transición y la parte mesenquimatosa era un hemangiosarcoma de elevado grado de malignidad histológica (ilustración 10 y 11).



**Ilustración 8. Tumores en vejiga de la orina. Necropsia vaca V1**





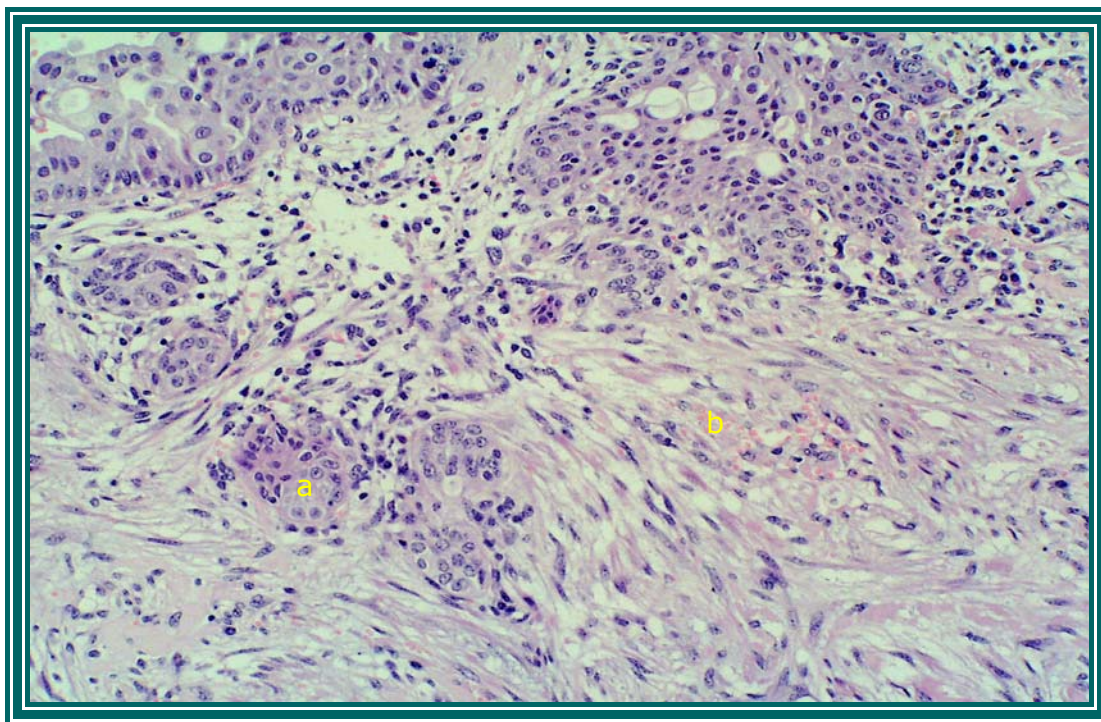
**Ilustración 9. Tumores en vejiga de la orina. Necropsia vaca V4**

La necropsia de la vaca que no presentaba macrohematuria (V4), también de la explotación A (grupo A1, reflejó un engrosamiento difuso de la pared de la vejiga de la orina y un enrojecimiento de la mucosa. Histológicamente se diagnosticó como cistitis con hiperplasia con algunas zonas displásicas.

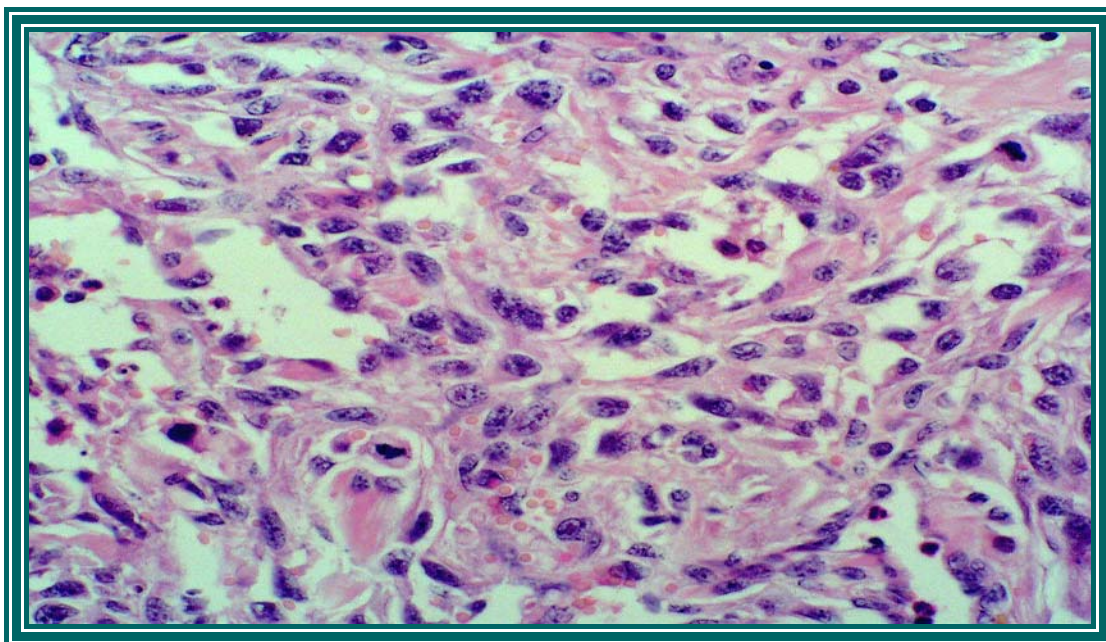
En las necropsias realizadas no se hallaron otras alteraciones macroscópicas excepto la transformación de médula ósea (femoral) en los casos V1, V2 y V3 a una sustancia grasa amarillenta (severa atrofia). Los hallazgos histológicos coincidentes en los 4 casos fueron: nefritis intersticial crónica leve, de leve a moderada enteritis parasitaria crónica, hepatitis multifocal crónica leve y de leve a moderada atrofia de la pulpa blanca y roja del bazo. En uno de los casos (V2) se observó angiomas capilar focal en el hígado.

El estudio estadístico multivariante de los valores analíticos sanguíneos y urinarios de las vacas necropsiadas, incluyó a estos animales en las diferentes clases: dos de las vacas con hematuria (V2 y V3) se incluyeron

en el grupo A1 clase 3 y la vaca sin hematuria macroscópica (V4, cistitis hiperplásica) fue incluida en el grupo A1 clase 2. El animal V1 no presentó datos completos en todas las variables por lo que fue excluido del estudio multivariante.



**Ilustración 10. Necropsia vaca 4, con HEB tumor en vejiga de la orina (H/E), tumor mixto: carcinoma de transición (a)/hemangiosarcoma (b)**



**Ilustración 11. Necropsia vaca 4, detalle de la porción hemangiosarcomatosa.**

## **DISCUSIÓN**

---

### **A. Fases clínicas de la HEB**

Una de las principales aportaciones del estudio de los valores analíticos del ganado vacuno expuesto al consumo de helechos, es el análisis de explotaciones completas y la caracterización de la HEB en fases cronológicas del desarrollo de la intoxicación, a través del análisis estadístico de las variables múltiples realizado. Este trabajo caracteriza, por primera vez, la existencia de fases consecutivas en el curso de la enfermedad con cambios analíticos específicos, que hasta la fecha no habían sido descritas.

En el estudio de las tres explotaciones, hemos podido determinar la existencia de grupos de animales (clases) que agrupan a los animales en función de los cambios analíticos y su intensidad.

El estudio se ha realizado en dos periodos diferentes de tiempo y en distintas explotaciones, obteniéndose resultados similares que se repiten en el tiempo. Este hecho refuerza la existencia de distintas etapas en la intoxicación crónica por helechos, determinadas por parámetros analíticos sanguíneos y urinarios, que, en nuestra opinión representan diferentes fases de la enfermedad.

En el grupo A se establecieron 3 grupos de animales con resultados analíticos similares.

Clase 1 (fase inicial con muchos parámetros normales y una monocitosis elevada), clase 2 (fase intermedia con valores normales en algunos parámetros y niveles altos de monocitos) y clase 3 (fase final con numerosos parámetros alterados y niveles normales de monocitos). Los hallazgos de las necropsias realizadas en esta explotación, corroboran las fases analíticas de la enfermedad, las dos vacas con neoplasias en la vejiga de la orina, se encontraban en el estado final (clase 3, grupo A1), mientras que la vaca con cistitis e hiperplasia (considerada como posible lesión pretumoral <sup>(Sardon et al. 2005)</sup>) se incluyó en la fase intermedia (clase 2, grupo A1).

Las dos clases de animales obtenidas del análisis de variables múltiples en el grupo B: clase 1 (fase inicial, parámetros normales con monocitosis) y clase 2 (fase intermedia, alteraciones leves o moderadas en los parámetros con niveles normales de monocitos), son comparables a las clases obtenidas en el grupo A1. En la granja B no se estableció una tercera clase de animales en estado final de HEB, probablemente debido a la menor severidad de la intoxicación en estos animales respecto a los de la explotación A, posiblemente debido al manejo nutricional con suplemento en épocas de escasez de pasto en el grupo B.

Los hallazgos analíticos en las vacas adultas eran muy similares en las dos explotaciones A y B, lo que le da coherencia a nuestros hallazgos.

En el grupo C, se caracterizaron tres clases de animales en función de los valores analíticos alterados más importantes: la clase 1 compuesta por animales jóvenes de edad media 4,6 años, con valores analíticos normales en la serie blanca y roja y con monocitosis moderada; la clase 2, en la que se incluyen animales adultos con una media de edad de 8 años, y con alteraciones de los valores de leucocitos de moderadas a bajas sin monocito-

sis; la clase 3 integrada por animales de edad media 10 años con alteraciones moderadas en la serie blanca, leucopenia y linfopenia, con valores normales de monocitos.

En conjunto, las alteraciones analíticas en el grupo C son menores que en los grupos A y B, probablemente debido a un consumo de helechos menor, ya que estos animales reciben un suplemento alimenticio diariamente.

Los resultados en animales más jóvenes (grupo A2) indican que una ingestión crónica de helechos durante menos tiempo, afecta a los parámetros hematológicos antes de que aparezcan las lesiones de la vejiga, cursando con un nivel de monocitos bajo en algunos animales y monocitosis elevada en una proporción importante de ellos (31%).

En el estudio estadístico de todos los animales en conjunto (n=161) se establecieron dos clases (1, n=27 y 2, n=134), que agrupan a los animales en función de variables estadísticas comunes. Dada la diferencia de intensidad de las alteraciones en las tres granjas, debido probablemente al manejo alimentario, no se pudieron establecer con claridad diferencias en cuanto a edad y alteraciones significativas del estudio inter-granja.

## **B. Monocitosis como marcador de enfermedad inicial**

Uno de los hallazgos más importantes que además no ha sido descrito con anterioridad es el significativo incremento del nivel de monocitos en sangre encontrado en la mayoría de los animales del grupo A1 (53%), y en menor cantidad en los grupos B (38%), A2 (31%) y C (9%). La monocitosis no había sido descrita previamente en casos de HEB, salvo en un animal con HEB, <sup>(Gabriel *et al.* 2009)</sup> lo que se puede atribuir al hecho de que en otros estu-

dios anteriores se han analizado vacas con hematuria clínica, es decir, en la fase final de la enfermedad, en la que, de acuerdo con nuestros datos, el nivel de monocitos se encuentra dentro de los valores normales.

Los monocitos son leucocitos de la serie de los agranulocitos, que se caracterizan por tener un núcleo de forma variable y un citoplasma de color azul-gris, que se vacuoliza frecuentemente. Están ausentes, o presentes en cantidades reducidas (2-7% del total de leucocitos) en la sangre periférica y son muy similares morfológicamente y cuantitativamente en todas las especies domésticas (Schalm y Jain 1986).

En ganado vacuno adulto se estiman valores normales de hasta 0,3 miles/mm<sup>3</sup> con un rango que varía entre 0-6% (Plonait 1980) o 2-7% de los leucocitos (Weiss et al. 2010).

La monocitosis, definida como un aumento del número de monocitos en sangre puede estar producida por distintas causas. En el ganado bovino se ha descrito en enfermedades crónicas por un estímulo crónico sobre el sistema retículo endotelial como la tuberculosis, micosis, listeriosis, brucelosis, toxoplasmosis, abscesos múltiples y en presencia de tumores de la médula ósea como la leucosis monocítica (Dirksen et al. 2005). Tras la administración de medicamentos como la dexametasona, se observa monocitosis asociada a leucocitosis, neutrofilia, eosinopenia y linfopenia (Anderson et al. 1999). Los monocitos también aumentan en casos de estrés, por la liberación de cortisol en el parto (Meglia et al. 2005) o por la reacción a la presencia de parásitos sanguíneos (*Trypanosoma vivax*) (Silva et al. 1999).

En conejos parasitados por garrapatas y alimentados con una dieta basada en semillas de *Jatropha curcas*, planta con efecto acaricida, produce una elevada monocitosis (Abdel-Shafy et al. 2011).



Se ha encontrado una marcada monocitosis y un incremento en los niveles de TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) en ratas a las que se le administraban dosis intravenosas múltiples de PTA (ptaquilósido activado, el carcinógeno más potente presente en el helecho) (Shahin *et al.* 1998) ; estos autores sugieren que la exposición al PT puede demostrarse valorando los niveles de monocitos y TNF $\alpha$  en sangre circulante.

Nuestro estudio indica también la aparición de monocitosis tras la exposición natural al helecho, posiblemente como reacción inicial frente a su acción tóxica o carcinogénica. De acuerdo con nuestros resultados, la monocitosis se podría emplear como indicador diagnóstico inicial de animales intoxicados en las fases previas (preclínicas) de la enfermedad, ya que, aunque la monocitosis puede aparecer en diversos procesos patológicos, que hemos mencionado anteriormente, no es frecuente en grandes animales (Van Metre 2009).

Como hemos indicado, la intensa monocitosis existente en las fases iniciales de la HEB, podría indicar una reacción temprana a alguno de los componentes tóxicos y carcinógenos del helecho como el PT y podría usarse como marcador temprano de la enfermedad. Los porcentajes de monocitos altos o muy altos en los grupos puede sugerir además de la exposición al consumo de helechos, la intensidad del consumo: 53% de animales con monocitosis del grupo A1 frente al 9% del grupo C sujeto a un suplemento nutricional diario.

Este hecho es especialmente notorio en el 31% de los animales jóvenes del grupo A2, que manifestaron monocitosis sin otra alteración significativa. Los valores normales de monocitos en valores absolutos encontrados en la fase final de la enfermedad de todos los grupos estudiados, podría ser reflejo de



la depresión general de médula ósea que causa panleucopenia debida a las sustancias toxicas mielosupresoras presentes en el helecho <sup>(Valli y Parry 1993)</sup>, ya que los porcentajes relativos de monocitos se mantienen elevados (18-20,4%). durante las distintas fases de la enfermedad en el 65% de todos los animales estudiados.

### **C. Otros hallazgos analíticos de interés**

Las plaquetas se encontraron disminuidas en la mayoría de los animales de los grupos A1 (80%) y B (90%). Un porcentaje menor de animales del grupo A2 (38%) presentaba un nivel bajo de plaquetas y en el grupo C existieron valores casi normales en el 70% de los animales. Una vez más la severidad de las alteraciones analíticas es menor en el grupo C y sugiere una relación entre el manejo nutricional y la afectación de los animales.

Se han descrito varias sustancias hemolíticas y hemorrágicas en los helechos <sup>(Tjatur Rasa *et al.* 1999)</sup>. Aunque las plaquetas y el fibrinógeno (grupo A1) estaban disminuidas en la mayoría de los animales, los tiempos de coagulación (TP, TTP) fueron normales. Basándose en nuestros resultados no se puede confirmar una función alterada del sistema hemostático en los animales analizados, en consonancia con otros estudios (Evans 1958; Jarrett *et al.* 1978; Divers y Van Metre 2002; Di Loria *et al.* 2011). Los niveles bajos de fibrinógeno pueden estar relacionados con una producción hepática disminuida aunque las enzimas hepáticas estaban dentro de los límites normales.

Los parámetros analíticos de la función renal estudiados eran normales en el 94% de los animales analizados.

Otro hallazgo interesante es la elevada proporción de gamma-globulinas encontrada: 66% grupo A1 y 86% grupo B; este aumento junto con la hipoalbuminemia encontrada en algunos de los animales (39% grupo A1, 18% grupo B probablemente debido a malnutrición y pérdida de sangre) es el responsable de que la relación albúmina / globulina sea baja en el 63% del grupo A1 y 77% del grupo B.

Se ha observado un incremento de las globulinas totales en HEB reproducida experimentalmente en terneros <sup>(Prasad y George 1986)</sup>. En este estudio la producción incrementada de gamma-globulinas se atribuye a una respuesta de las células plasmáticas por un estímulo crónico antigénico, pudiendo estar relacionado con la ingestión del helecho al no encontrarse otras enfermedades coexistentes. Hecho que coincide con los datos de nuestro estudio donde no encontramos otras enfermedades presentes.

La leucopenia existente en los animales de los distintos grupos estudiados (44% grupo A1, 44% grupo B y 14% grupo C), coinciden con los estudios previos publicados y siguen el patrón de los demás valores estudiados, que se presentan en menor intensidad en el grupo C. La linfopenia aparece en el 65%, 15%, 29% y 18% y de los grupos A1, A2, B y C, respectivamente, repitiéndose la disminución de la menor severidad de los cambios analíticos en los cuatro grupos analizados (A1, A2, B y C).

El menor porcentaje de animales con anemia, leucopenia y neutropenia severas de nuestro estudio puede deberse a varios factores: la influencia del periodo de año en el que se realizó el muestreo (febrero y mayo) cuando el consumo de helecho es mínimo en las dos primeras explotaciones A y B, y septiembre, época de teórico máximo consumo en la explotación C.

Pero no hemos podido establecer una relación definitiva entre las alteraciones encontradas, y la época del año en la que se realizó el estudio debido probablemente a los distintos manejos alimentarios. También se desconoce el tiempo que pueden tardar en hacer su efecto tóxico/carcinogénico los componentes nocivos del hebrecho.

En nuestro estudio, el examen microscópico del sedimento urinario, reveló la presencia de hematuria en un 19% (grupo A1) y un 17% (grupo B) de las vacas. El hecho de que en ambos casos los datos del historial de hematuria macroscópica fueran menores (10% y 2%, respectivamente) es indicativo o bien de que sus estimaciones no fueron correctas o de que en muchos casos esta hematuria no fuese macroscópicamente visible (microhematuria) lo que dificulta su diagnóstico.

Se observó microhematuria en el 45% de los animales del grupo A1 y en el 34% del grupo B.

El sondaje uretral utilizado para obtener orina en algunos animales (n= 8) pudo incrementar ligeramente la presencia de glóbulos rojos y proteínas en la orina en un número reducido de animales.

Un 50% de las vacas del grupo A1 y un 39% del grupo B presentaban células desescamadas procedentes del epitelio de transición de las vías urinarias en valores superiores a los considerados normales para la especie (1-2 por campo, 40X). Además, se observaron respectivamente, un 40% y un 17% de citologías que presentaban nidos celulares, generalmente asociados al desarrollo de procesos hiperplásicos y proliferativos en el epitelio de las vías urinarias. El estudio citológico con técnicas convencionales no permitió diagnosticar con precisión el tipo de proceso hiperplásico/inflamatorio.

La presencia de bacterias en la orina fue de un 8,8% en el grupo A1 y un 17% en el grupo B. Debido al pequeño número encontrado y a la ausencia de piuria en todas las muestras analizadas determino que su presencia podía deberse a una contaminación durante la recogida de la orina. Además, este hecho permitió descartar que las cistitis fueran causadas por procesos infecciosos. El diagnóstico diferencial entre las cistitis de origen infeccioso y las causadas por ingestión la crónica de helechos reside en la presencia de piuria de vacas afectadas por cuadros infecciosos (Radostis *et al.* 1994). La ausencia de las mismas en nuestras muestras confirma que las cistitis crónicas no son de origen infeccioso, si no que parecen relacionarse con la ingestión crónica de helechos.

Todos los estudios publicados con anterioridad (Giurgiu *et al.* 2008; Gabriel *et al.* 2009; Di Loria *et al.* 2011) estudian los valores analíticos de los animales con HEB clínica, seleccionando de entre amplios colectivos, los animales que presentan hematuria, pero no analizan el resto de los animales que comparten el mismo manejo y por tanto el mismo riesgo de contraer la enfermedad. Hay pocos estudios publicados sobre parámetros analíticos de vacas que sufren BEH (Pamukcu *et al.* 1967; Pamukcu *et al.* 1976; Muralimanohar y Balakrishnan 1995; Marrero *et al.* 2001; Divers y Van Metre 2002; Giurgiu *et al.* 2008; Gabriel *et al.* 2009; Di Loria *et al.* 2011). La intoxicación crónica por helecho común además de los tumores en vejiga urinaria, causa supresión medular y como consecuencia pancitopenia (Valli y Parry 1993) cuyo origen son las toxinas mielosupresoras encontradas en las plantas (Hirono *et al.* 1984; Hopkins 1990).

En general los resultados de este estudio corroboran los resultados de estudios previos, aunque las anormalidades encontradas son menos graves que aquellas indicadas en los otros estudios (anemia menos severa, ausencia de

piuria) que son en su mayoría intoxicaciones crónicas inducidas experimentalmente o estudios sobre animales con HEB en fases finales.

Existe coincidencia en el porcentaje de HEB encontrado otros estudios, con valores entre el 10%,21% y superiores al 50% que han sido descritos en estudios en Turquía, Portugal e India respectivamente <sup>(Di Loria et al. 2011)</sup>, pero los valores medios encontrados en las explotaciones estudiadas, coinciden con estudios recientes en zonas geográficas y climáticas similares a España, como Italia <sup>(Di Loria et al. 2011)</sup>.

#### **D. Importancia del diagnóstico de animales con HEB subclínica y su implicación en la sanidad humana y animal**

La intoxicación crónica por helecho común (*Pteridium*) causa hematuria enzoótica bovina (BEH) en vacas que lo ingieren durante periodos prolongados y produce lesiones hemorrágicas y/o neoplásicas en vejiga de la orina <sup>(McKenzie 1978; Smith et al. 1988; Xu 1992; Jubb et al. 1993; Van Metre 2009)</sup>. Existen evidencias epidemiológicas que indican los efectos del helecho y sus derivados sobre la salud humana. La especie humana padece las consecuencias del efecto carcinógeno del helecho y desarrolla tumores en diversas localizaciones orgánicas tras el consumo directo de la planta o mediante la ingestión de alimentos procedentes de ganado vacuno (leche y derivados) alimentado con esta planta <sup>(Alonso-Amelot et al. 1992; Alonso-Amelot et al. 1998; Shahin et al. 1999)</sup>. En este sentido, en determinadas zonas geográficas, la mayor presencia de cáncer de esófago y estómago en la especie humana se ha relacionado con el consumo directo o

indirecto de los carcinógenos de los helechos (Hirayama 1975; Galpin *et al.* 1990). En varios estudios publicados, se relaciona de forma clara que el cáncer de estómago tiene mayor incidencia en áreas donde las vacas se alimentan de forma natural con helechos (Villalobos-Salazar 1985). En 1996, Alonso-Amelot publicó un artículo en la prestigiosa revista *Nature*, alertando sobre el riesgo de ingerir leche procedente de bovinos alimentados con helechos, ya que contenía hasta un 9% del ptaquilósido (PT, el mayor carcinógeno contenido en el helecho) ingerido por los animales al pastar helechos (Alonso-Amelot *et al.* 1996). El paso de los carcinógenos del helecho a la leche ya había sido previamente demostrado por Evans *et al.* (Evans *et al.* 1972). Estudios posteriores (Pamukcu *et al.* 1978; Evans 1987), habían confirmado que la leche procedente de vacas que comen helechos contenía metabolitos carcinógenos, tóxicos y mutagénicos que no se hallaban en la leche de vacas normales.

Los animales que consumen helechos excretan PT con poder carcinógeno por leche y orina (Pamukcu *et al.* 1966; Pamukcu *et al.* 1967; Evans *et al.* 1972; Pamukcu *et al.* 1980; Villalobos-Salazar *et al.* 1990; Alonso-Amelot *et al.* 1992; Alonso-Amelot *et al.* 1996; Alonso-Amelot *et al.* 1998).

Este hecho, parece indicar una distribución sistémica del compuesto y un probable acumulo en músculo o vísceras tales como el hígado, destinadas al consumo humano y de los animales (Sardon 2006).

En la actualidad, se desconoce la cantidad de PT que se almacena en estos tejidos y que podría, por tanto, afectar al consumo humano. Los estudios para la detección de las concentraciones de este compuesto en los tejidos de ganado vacuno resultarían de gran interés para esclarecer las evidencias epidemiológicas existentes acerca de los efectos del helecho y sus derivados sobre la salud humana. No obstante, el correcto aislamiento de esta molécula resulta de gran dificultad debido a su inestabilidad, ya que, en condi-

ciones acuosas, se transforma gradualmente en pterosina B (forma inactiva) (Hikino et al. 1970; Sardon 2006). Finalmente, el método de detección y purificación del PT mediante HPLC ha sido publicado (Ojika et al. 1987; Smith et al. 1994; Burkhalter et al. 1996), gracias al cual han comenzado las investigaciones sobre su bioquímica, efecto mutagénico y presencia en fluidos orgánicos, aunque por el momento no existe un método realmente eficaz y fiable.

El problema de la HEB desde el punto de vista clínico es el diagnóstico, el único procedimiento diagnóstico ante-mortem de la enfermedad está basado en la hematuria macroscópica clínica y el acceso del ganado a pastos infestados con helecho común, o la realización de análisis de orina para determinar microhematuria (Sánchez-Villalobos et al. 2006).

La hematuria ocurre en casos avanzados pero puede estar ausente en fases iniciales de la enfermedad (cistitis crónica) (Van Metre 2009) o en tumores carcinomatosos de vejiga sin componente hemático (Divers y Van Metre 2002; Gabriel et al. 2009). Es decir, es posible que haya animales con HEB subclínica cuyos productos pasen al consumo humano al no ser detectados como enfermos. Es necesario desarrollar métodos o estrategias diagnósticas que permitan la identificación de estos animales. En este sentido, este trabajo de Tesis Doctoral da un paso adelante al indicar la monocitosis y la posible utilización de combinaciones de valores analíticos obtenidos en los estudios estadísticos multivariantes en las clases de fases iniciales, como unos posibles indicadores de enfermedad temprana.

La detección de animales con HEB inicial también es importante desde el punto de vista ganadero. La ausencia de hematuria macroscópica en estos animales no permite tomar medidas correctivas ni preventivas en el manejo y la alimentación de los animales expuestos para prevenir su aparición.

Uno de los objetivos de este trabajo era buscar parámetros específicos de la enfermedad en su estado inicial con la utilidad potencial de ser marcadores para un diagnóstico clínico precoz, ya que las vacas expuestas inicialmente al helecho sin hematuria clínica, pueden estar excretando o acumulando carcinógenos.

Como ya se ha señalado, la monocitosis puede ser un factor precoz para detectar animales expuestos al consumo de helechos en las fases tempranas de la enfermedad.

En un estudio realizado en Brasil, con vacas intoxicadas naturalmente por helechos, se encontró que aquellos animales que presentaban microhematuria, tenían unos valores hematológicos normales y algunos de los animales que presentaban macrohematuria, tenían leucocitosis con neutrofilia y linfopenia. Aunque los autores no lo mencionan, cabe destacar que en los resultados aportados en las tablas del estudio, los valores de monocitos resultaron aumentados en las vacas que presentaban microhematuria respecto a las que padecían macrohematuria (Falbo et al. 2005 ). Lamentablemente, este trabajo se publicó en una revista nacional brasileña (Semina: Ciênc. Agrá) no recogida en el JCR del ISI.

En este estudio se han analizado tres explotaciones con HEB en zonas geográficas distintas, durante varios años y en estaciones diversas (primavera, otoño e invierno) el factor estacional puede ser muy importante, pues los consumos de helechos pueden estar directamente relacionados con el clima, que influye en la cantidad de pasto y puede variar de año en año, pero en función de nuestros resultados, no hemos podido demostrar una influencia clara.



En el 2002 al comienzo del estudio, en la primera explotación ganadera, tanto el propietario como los técnicos de la zona, desconocían la causa de la presencia de vacas con HEB, y no se suplementaba con forraje ni concentrado a las vacas durante las épocas de pasto, sobre todo en verano.

En el caso de las explotaciones B (2002) y C (2011) respectivamente, los propietarios sí conocían que la causa de la enfermedad, era el consumo de helechos y comenzaban a tomar medidas correctoras para tratar de minimizar el consumo de esta planta por parte del ganado, suplementando con forrajes (paja de cereales, heno de hierba, avena en rama) y concentrado a los animales.

En la explotación B se suplementaba con forraje al final del verano y en la explotación C se suplementaba diariamente durante toda la época de pastos.

La incidencia de HEB y la severidad de las alteraciones analíticas está probablemente relacionada con el manejo nutricional de las explotaciones, planteamiento que coincide con la distinta incidencia de la enfermedad descrita en las tres explotaciones, que fue máxima en la primera A, sin suplemento nutricional y menor en la tercera C, que tenía un suplemento alimenticio durante todo el año.

Podemos establecer también una posible relación entre el número de animales con hematuria clínica, anemia, leucopenia y trombocitopenia y el tipo de alimentación administrado a los animales en las distintas explotaciones estudiadas.

En un futuro, sería importante disponer de métodos de diagnóstico para detectar posible presencia de PT en productos animales destinados al consumo humano. La seguridad alimentaria cada vez presenta una exigencia

mayor en cuanto a la trazabilidad de los productos carnicos y su seguridad. La posibilidad de que productos procedentes de animales afectados de HEB puedan tener capacidad para producir cáncer en la especie humana esta justificando los estudios cada vez mas amplios realizados sobre la HEB, como el realizado en esta tesis y que ha permitido conocer la incidencia y la génesis de la enfermedad en explotaciones reales.

Hasta la fecha la relación entre la HEB y el cáncer en la especie humana, no ha producido una alarma social, aunque es previsible que esto pueda acontecer y por tanto seria necesario tener toda la información disponible para informar a la opinión pública en materia de seguridad alimentaria.

La garantía de los productos destinados al consumo humano es un requerimiento del consumidor europeo y una preocupación de las administraciones de la Unión Europea, donde existen países con una prevalencia importante de la enfermedad. Del conocimiento de las regiones o zonas con este problema podrían depender futuras actuaciones de las administraciones con competencias en el sector agropecuario dirigidas a la no-utilización de determinados pastos "infestados" de helechos, mediante campañas de información dirigidas al ganadero o promoviéndose modificaciones en los sistemas de manejo en las zonas de riesgo <sup>(Sardon 2006)</sup>.

## **E. Importancia del estudio en el contexto de la HEB en españa**

Existen muy pocas referencias sobre esta enfermedad en nuestro país, pese a que se conoce la existencia de regiones en las que el ganado bovino tiene

acceso al consumo de helechos durante ciertos periodos al año, en el norte de la Península y en zonas de montaña del resto <sup>(Castroviejo *et al.* 1986)</sup>. El incremento en los últimos años del número de animales que se alimentan de pastos en determinadas áreas de nuestro país, como consecuencia del aumento del número de vacas de aptitud cárnica, (1.886.731 cabezas <sup>(Ministerio del medio ambiente rural y marino, 2010)</sup>) hace que pueda aumentar la incidencia de la HEB. La cría de ganado vacuno en extensivo está subvencionada por la Unión Europea y este hecho puede propiciar un manejo alimentario deficiente en el ganado en extensivo debido a la sobreexplotación de los pastos, al no existir una regulación del número de animales por hectárea, sobre todo en pastos públicos o dehesas comunales.

Otros aspectos a tener en cuenta y que favorecerían la ingesta de helechos por parte del ganado vacuno y por tanto un incremento en el número de animales afectados, como se ha comentado anteriormente, es la sequía, los incendios de bosques, el uso de métodos agropecuarios inadecuados y la deforestación en general que, en los últimos años está en aumento. Estos factores están provocando que *Pteridium spp.* se encuentre en expansión en todo el mundo <sup>(Smith y Seawright 1995)</sup>.

El helecho (*Pteridium spp.*) es una de las plantas más comunes en la tierra, oportunista y muy resistente a condiciones adversas y a las enfermedades <sup>(Smith y Seawright 1995)</sup>. Todas estas características, hacen que *Pteridium aquilinum*, esté actualmente en expansión en España debido a la actual situación de sequías periódicas y desertización.

## **F. Originalidad, fiabilidad y posibles mejoras del estudio**

El estudio que presentamos sobre los valores analíticos de ganado vacuno expuesto naturalmente al consumo de helechos, es el primero que se realiza en España sobre la Hematuria Enzoótica Bovina (HEB) y, como ya hemos indicado, uno de los pocos en el ámbito internacional en estudiar colectivos completos de animales expuestos crónicamente al consumo de helechos con una gran proporción de animales sin tumores instaurados. Además, se han tenido en cuenta aspectos nuevos de la enfermedad que nunca antes se habían descrito y que han permitido abordar el estudio de la HEB de forma más completa, desde el inicio de la enfermedad, hasta las fases finales.

El rigor de nuestro estudio se ve reforzado por el gran número de animales incluidos, existiendo un elevado porcentaje de animales expuestos al consumo de helechos sin signos de hematuria. El estudio habría sido más completo si se hubieran realizado urianálisis de todos los animales en los que se realizó la analítica sanguínea. Sin embargo, creemos que el número de muestras urinarias son suficientes para llegar a conclusiones válidas.

En este trabajo se ha abordado el estudio de una enfermedad que parece emergente en nuestro país y de gran importancia por sus posibles repercusiones sobre la salud humana y la rentabilidad del sector agropecuario. En él se han tenido en cuenta nuevos aspectos de la HEB. Creemos que es necesaria la realización de nuevos estudios que permitan analizar más en profundidad factores que han sido expuestos en esta Tesis Doctoral.



## CONCLUSIONES

---

1. En las explotaciones de ganado vacuno expuestas al consumo de helechos y afectadas por HEB existen distintas fases de la enfermedad que se pueden identificar en función de los valores analíticos. Dichas fases se identifican en las distintas zonas geográficas estudiadas e independientemente de la época del año.
2. La fase inicial de la enfermedad se presenta en animales jóvenes y se caracteriza por la ausencia de hematuria y valores normales en todas las variables estudiadas salvo marcadas trombocitopenia y, monocitosis.
3. La fase intermedia se caracteriza por valores normales del hemograma, niveles bajos-normales de leucocitos con linfopenia, moderada monocitosis, hipoalbuminemia, hipergammaglobulinemia, relación albumina/globulina baja y moderada microhematuria.
4. La fase final se presenta en animales de edad avanzada con hematuria y numerosos parámetros alterados: número de eritrocitos bajo, hematocrito bajo, hemoglobina baja, leucopenia, neutropenia, linfopenia, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipogammaglobulinemia, microhematuria, leucosuria y bilirrubinuria, y valores normales de monocitos y plaquetas.
5. Considerando que se trata de explotaciones cerradas, que se mantienen con la cría de la explotación, sin adquisición de animales adultos, las fases iniciales se detectan de forma significativa en animales jóvenes.

6. La monocitosis se presenta en fases iniciales de la enfermedad, cuando no se ha instaurado todavía la hematuria clínica y se podría utilizar como método analítico de diagnóstico precoz de animales con HEB.
7. El manejo nutricional de los animales disminuye la prevalencia de fases avanzadas de HEB. Las alteraciones analíticas observadas disminuyen de intensidad en las explotaciones con la administración de suplemento alimenticio.

## RESUMEN

---

La hematuria enzoótica bovina (HEB) es un síndrome caracterizado por una hematuria persistente, anemia y hemorragias producidas por la existencia de tumores urinarios inducidos por la ingestión crónica de helecho común (*Pteridium spp.*). Nuestro objetivo ha sido describir los cambios analíticos en sangre y orina en explotaciones de ganado bovino con antecedentes de intoxicación por ingesta crónica de helecho común para determinar parámetros con potencial valor diagnóstico y si existen cambios en los valores analíticos en función de los distintos manejos nutricionales de las explotaciones. Este estudio fue llevado a cabo en tres explotaciones bovinas con antecedentes de HEB, la explotación A con vacas de raza cárnica local en extensivo y las explotaciones B y C, integradas por vacas cruzadas de aptitud cárnica, también en extensivo, pero con variaciones en el manejo nutricional. Los animales se clasificaron en cuatro grupos: grupo A1 (explotación A, 66 vacas), grupo A2 (explotación A, 13 novillas), grupo B (explotación B, 54 vacas) y grupo C (explotación C, 74 vacas). Se usaron 10 vacas sanas como control. Se realizó un examen físico completo (grupos A1, B y C), se recogieron muestras de sangre (grupos A1, A2, B y C) y muestras de orina (grupos A1 y B). Se realizaron necropsias con estudio histopatológico completo en 4 vacas. Se realizó un completo estudio estadístico con análisis univariantes y multivariantes, considerándose significativas las asociaciones con  $p < 0,05$ . Los resultados analíticos mostraron anemia, leucopenia, monocitosis, trombocitopenia, hipergammaglobulinemia, microhematuria y proteinuria en algunos de los animales. Los análisis estadísticos multivariantes establecieron tres fases de la enfermedad con incremento en la severidad:



una fase inicial caracterizada por una monocitosis extremadamente elevada y la mayoría de parámetros estudiados en valores normales; una fase intermedia con alteraciones analíticas moderadas y monocitosis y una fase final con la mayoría de parámetros alterados pero con niveles normales de monocitos. Nuestros resultados indican que en las explotaciones de ganado vacuno expuestas al consumo de helechos y afectadas por HEB existen distintas fases de la enfermedad que se pueden identificar en función de los valores analíticos. Las diferentes fases de la enfermedad se observaron en las explotaciones radicadas en distintas zonas geográficas estudiadas e independientemente de la época del año. En conclusión, la monocitosis se presenta en fases iniciales de la enfermedad, en animales jóvenes y se podría utilizar como método analítico de diagnóstico precoz de animales con HEB. El manejo nutricional disminuye la prevalencia de fases avanzadas de HEB y las alteraciones analíticas observadas disminuyen de intensidad en las explotaciones con la administración de suplemento alimenticio.

## SUMMARY

---

Bovine enzootic haematuria (BEH) is a syndrome characterized by persistent haematuria, anaemia and haemorrhages due to the existence of urinary bladder tumours induced by the chronic ingestion of bracken fern (*Pteridium* spp.). Our objective was to describe analytical changes in blood and urine in a large group of animals exposed to chronic bracken fern toxicity, in order to find parameters of potential diagnostic value and if the different nutritional management in the three livestock, have some influence in analytical values. This study was carried out in three livestock farms with known BEH: farm A,B,C with local breed grazing cows. Animals were classified into four groups: group A1 (farm A, 66 cows), group A2 (farm A, 13 heifers), group B (farm B, 54 cows) and group C (farm C, 74 cows).with different nutritional management Ten healthy cows were used as controls. Complete physical examination was performed (group A1, B, C), and blood (groups A1, A2, B and C) and urine samples were collected (groups A1 and B). Necropsies and histopathology were done in 4 cows. Multivariate and unvaried statistical analyses was done consideration significative association,  $p < 0,05$ . Anaemia, leukopenia, monocytosis, thrombocytopenia, hypergammaglobulinemia, microhaematuria and proteinuria were detected in some animals. Multivariate statistical analyses established three phases of the disease with increasing severity; an initial phase characterized by an extremely high monocytosis and many normal parameters; and intermediate phase with moderate analytical alterations and monocytosis, and a final phase with many altered parameters and normal levels of monocytes. Ours resulted sow that in livestock's espoused bracken fern consume with clinical

BEH, exist different phases of the disease that can be identified with analytical values. This phases has present in the different geographic studied zones and independent of the year season. Monocytosis, detected in younger animals, is present in initial phases and could represent an initial response to bracken fern consumption, and it might be useful as an early haematological marker of BEH .The nutritional management decrease the prevalence of BEH final phases and analytical changes severity.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Abdel-Shafy S, Nasr SM, Abdel-Rahman HH and Habeeb SM. Effect of various levels of dietary *Jatropha curcas* seed meal on rabbits infested by the adult ticks of *Hyalomma marginatum marginatum* I. Animal performance, anti-tick feeding and haemogram. *Trop Anim Health Prod* 2011; 43(2): 347-357.

Almond N. Fern poisoning. *J Comp Pathol Therapeut* 1984; 7: 165-167.

Almudevar E, Puras A, De Miguel C, Urbiola E, Lopez-Cousillas A, Menendez E, Garcia de Jalon J and Romeo I. [Value of the expression of p21RAS, P53, Bcl-2 oncoproteins and Ki-67(MIB-1) antigen of cellular proliferation in the diagnosis and prognosis of thyroi]. *An Sist Sanit Navar* 2000; 23(2): 247-255.

Alonso-Amelot M, Castillo U, Smith BL and Lauren DR. Excretion, through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. *Lait* 1998; 78: 413-423.

Alonso-Amelot ME and Avendaño M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. *Int J Cancer* 2001; 91(2): 252-259.

Alonso-Amelot ME, Castillo U, Sanches MD and De Jong F (1992). Detection of ptaquiloside, the potent carcinogen of bracken fern in bovine milk. 203rd Natl Meeting Am Chem Soc.

Alonso-Amelot ME, Castillo U, Smith BL and Lauren DR. Bracken ptaquiloside in milk. *Nature* 1996; 382(6592): 587.

Anderson BH, Watson DL and Colditz IG. The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. *Vet Res Commun* 1999; 23(7): 399-413.

- Asano M, Ohkubo C, Sasaki A, Hibono I, Yamada K, Niwa H and Ojika M. Acute microcirculatory changes induced by intravenous administration to rabbits of ptaquiloside, a bracken carcinogen. *J Ethnopharmacol* 1989; 27(1-2): 213-220.
- Beniston RG, Morgan IM, O'Brien V and Campo MS. Quercetin, E7 and p53 in papillomavirus oncogenic cell transformation. *Carcinogenesis* 2001; 22(7): 1069-1076.
- Bradley D. (2000). "Ptaquiloside. The poison in bracken." from <http://www.chm.bris.ac.uk/>  
<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/ptq/ptqv.htm>.
- Bringuier PP, Piaton E, Berger N, Debruyne F, Perrin P, Schalken J and Devonec M. Bracken fern-induced bladder tumors in guinea pigs. A model for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147(3): 858-868.
- Burkhalter PW, Groux PMJ, Candrian U, Hubner P and Luthy J. Isolation, determination and degradation of ptaquiloside- a bracken fern (*Pteridium aquilinum*) carcinogen. *J Nat Toxins* 1996; 5(2): 141-159.
- Cairney M and Campo MS. The synergism between papillomavirus type 4 and quercetin is dependent on the timing of exposure. *Carcinogenesis* 1995; 16(8): 1997-2001.
- Campo MS and Jarrett WF (1986). Papillomavirus infection in cattle: viral and chemical cofactors in naturally occurring and experimentally induced tumors. *Ciba Foundation Symposium*.
- Campo MS, Jarrett WF, Barron R, O'Neil BW and Smith KT. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res* 1992; 52(24): 6898-6904.
- Campo MS, Jarrett WF, O'Neil W and Barron RJ. Latent papillomavirus infection in cattle. *Res Vet Sci* 1994; 56(2): 151-157.

- Campo MS, McCaffery RE, Doherty I, Kennedy IM and Jarrett WF. The harvey ras 1 gene is activated in papillomavirus-associated carcinomas of the upper alimentary canal in cattle. *Oncogene* 1990; 5: 303-308.
- Campo MS, Moar MH, Jarrett WF and Laird HM. A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. *Nature* 1980; 286: 180-182.
- Campo MS, O'Neil BW, Barron RJ and Jarrett WF. Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. *Carcinogenesis* 1994; 15(8): 1597-1601.
- Carvalho T, Naydan D, Nunes T, Pinto C and Peleteiro MC. Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic hematuria. *Vet Pathol* 2009; 46(2): 211-221.
- Carvalho T, Pinto C and Peleteiro MC. Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. *J Comp Pathol* 2006; 134(4): 336-346.
- Castroviejo S, Lainz M, López G, Montserrat P, Muñoz F, Paiva J and Villar L. *Flora Iberica. Plantas vasculares de la península Iberica e Islas Baleares*. 1986.
- Connolly JA, Morgan IM, Jackson ME and Campo MS. The BPV-4 co-carcinogen quercetin induces cell cycle arrest and up-regulates transcription from the LCR of BPV-4. *Oncogene* 1998; 16(21): 2739-2746.
- Costa-Durao JF, Lucilia FM, Cabral A, Conceicao PM, Afonso F and Correia J. Anatomopathological and clinical aspects of enzootic haematuria in cattle. *Rev Portug de Ciencias Vet* 1995; 17 ref.
- Di Loria A, Piantedosi D, Cortese L, Roperto S, Urraro C, Paciello O, Guccione J, Britti D and Ciaramella P. Clotting profile in cattle showing chronic enzootic haematuria (CEH) and bladder neoplasms. *Research In Veterinary Science* 2011.

- Di Loria A, Piantedosi D, Cortese L, Roperto S, Urraro C, Paciello O, Guccione J, Britti D and Ciaramella P. Clotting profile in cattle showing chronic enzootic haematuria (CEH) and bladder neoplasms. *Res vet sci* 2011.
- Dirksen G, Gründer HD and Stöber M. *Medicina interna y cirugía del bovino*. 2005 Buenos Aires, Intermédica.
- Divers TJ and Van Metre DC. Diseases of the renal system. Enzootic haematuria in Large Animal Internal Medicine. 2002.
- Döbereiner J, Tokarnia CH and Canella CFC. Ocorrência da hematuria enzootica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. *Pesq Agropec Brasil* 1967; 2: 489-504.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T and Webster G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 1989; 72: 168-178.
- Ertürk E, Pamukcu AM and Bryang TA (1974). Altered urinary and intestinal carcinogenic activity of bracken fern (*Pteris aquilina*) in albino rats by concurrent administration of bicarbonate, nitrate, and nitrite in drinking water. 1<sup>th</sup> Int. Cancer.
- Evans IA. Studies on bracken fern poisoning in cattle. Part V. *Brit vet J* 1958; 114: 253-267.
- Evans IA. The radiomimetic nature of bracken toxin. *Cancer Res* 1968; 28(11): 2252-2261.
- Evans IA. Bracken carcinogenicity. *Rev Environ Health* 1987; 7(3-4): 161-199.
- Evans IA. Bracken carcinogenicity. *Rev Environ Health* 1987; 7(3-4): 161-199.
- Evans IA, Al-Samarrai AMH and Smith RMM. Bracken toxicology: identification of some water soluble compounds from crozier and rhizome. *J Vet Sci* 1984; 34: 261-265.

- Evans IA, Jones RS and Mainwaring-Burton R. Passage of bracken fern toxicity into milk. *Nature* 1972; 237(5350): 107-108.
- Evans IA and Mason J. Carcinogenic activity of bracken. *Nature* 1965; 208(13): 913-914.
- Evans IA and Osman MA. Carcinogenicity of bracken and shikimic acid. *Nature* 1974; 250(464): 348-349.
- Evans WC, Evans ETR and Hughes LE. Studies on bracken poisoning in cattle. part I. *Brit Vet J* 1954; 110: 295-306.
- Evans WC, Widdop B and Harding JD. Experimental poisoning by bracken rhizomes in pigs. *Vet Rec* 1972; 90: 471-475.
- Falbo M, Faria A, Stipp M, Bracarense A, Araujo J, Okano N and Sandini I. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural em bovinos pela Samambaia *Pteridium aquilinum*. *Semina: Ciênc. Agrá.* 2005 26((4)): 547-558.
- Fazal F, Rahman A, Greensill J, Hadi SM and Parish JH. Starnd scission in DNA by quercetin and Cu (II): identification of free radical intermediates and biological consequences of scission. *Carcinogenesis* 1990; 11(11): 2005-2008.
- Fenwick GR. Bracken (*Pteridium aquilinum*)- Toxic effects and toxic constituents. *J Sci food agric* 1988; 46: 147-173.
- Fujimoto M, Ogino H and Hirono I. Influence of ptaquiloside on the development of newborn mice. *J Toxicol Sci* 1987; 12(2): 135-145.
- Fujita J, Ohuchi N, Ito N, Reynolds SH, Yoshida O, Nakayama H and Kitamura Y. Activation of H-ras oncogene in rat bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80(1): 37-43.
- Fukuoka M. Chemical and toxicological studies of bracken fern, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. VI. Isolation of 5-o-caffeoylshikimic acid as



an antithiamine factor. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1982; 30(9): 3219-3224.

Gabriel AL, Kommers GD, Masuda EK, Figuera RA, José Piazer JVM, Barros CSL, Martins TB and Rosa FB. Clinical and hematological aspects and urinary bladder lesions in chronic spontaneous poisoning by *Pteridium aquilinum* in cattle. . Pesq. Vet. Bras. 2009; 29(7): 515-525.

Gabriel AL, Kommers GD, Masuda EK, Figuera RA, Piazer JVM, Barros CSL, Martins TB and Rosa FB. Clinical and hematological aspects and urinary bladder lesions in chronic spontaneous poisoning by *Pteridium aquilinum* in cattle. . Pesq. Vet. Bras. 2009; 29(7): 515-525.

Galpin OP, Whitaker CJ, Whitaker RH and Kassab JY. Gastric cancer in Gwynedd. Possible links with bracken. Br J Cancer 1990; 6: 737-740.

Giurgiu G, Mircean M, Scurtu I and Popovici C. Epidemiological, clinical and paraclinical investigations in cattle enzootic haematuria in an area from N-W of Transilvania. . Bulletin UASVM, Veterinary Medicine 2008; 65(2): 12-15.

Giurgiu G, Mircean M, Scurtu I and Popovici C. Epidemiological, clinical and paraclinical investigations in cattle enzootic haematuria in an area from N-W of Transilvania. . Bulletin UASVM, Veterinary Medicine 2008; 65(2): 12-15.

Giurgiu G, Mircean M, Scurtu I and Popovici C. Epidemiological, clinical and paraclinical investigations in cattle enzootic haematuria in area from N-W of Transilvania Bulletin UASVM, Vet Med 2008; 65(2): 12-15.

Goto J, Kato S and Hoshikawa N. Pathological and morphological study of tumors of the bladder in Formosan cattle with haematuria. Jpn J Vet Sci 1954; 16: 209-218.

Hamir AN and Parry B. An abattoir study of bovine neoplasms with particular reference to ocular squamous cell carcinoma in Canada. *Vet Rec* 1980; 28: 551-553.

Hikino H, Takahashi T, Arihara S and Takemoto T. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1970; 18: 1488-1489.

Hirayama T. Epidemiology of cancer of the stomach with special reference to its recent decrease in Japan. *Cancer Res* 1975; 35(11 Pt. 2): 3460-3463.

Hirono I. Is quercetin carcinogenic? *Cancer Res* 1992; 83: 313-314.

Hirono I, Aiso S, Hosaka S, Yamaji T and Haga M. Induction of mammary cancer in CD rats fed bracken diet. *Carcinogenesis* 1983; 4(7): 885-887.

Hirono I, Fushimi K, Mori H, Miwa T and Haga M. Comparative study of carcinogenic activity in each part of bracken. *J Natl Cancer Inst.* 1973; 50: 1367-1371.

Hirono I, Ito M, Yagyu S, Haga M, Wakamatsu K, Kishikawa T, Nishikawa O, Yamada K, Ojika M and Kigoshi H. Reproduction of progressive retinal degeneration (bright blindness) in sheep by administration of ptaquiloside contained in bracken. *J Vet Med Sci* 1993; 55(6): 979-983.

Hirono I, Kono Y, Takahashi K, Yamada K, Niwa H, Ojika M, Kigoshi H, Niiyama K and Uosaki Y. Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent. *Vet Rec* 1984; 115(15): 375-378.

Hirono I, Mori H, Yamada K, Hirata Y and Haga M. Natural carcinogenic products of plant origin. *Natl Cancer Inst* 1975; 58: 1155-1157.

Hirono I, Mori H, Yamada K, Hirata Y and Haga M. Carcinogenic activity of petasitenine, a new pyrrolizidine alkaloid isolated from *Petasites japonicus* Maxim. *J Natl Cancer Inst.* 1977; 58(4): 1155-1157.

- Hirono I, Ogino H, Fujimoto M, Yamada K and Yoshida Y. Induction of tumors in ACI rats given a diet containig ptaquiloside, a bracken carcinogen. J Natl Cancer Inst. 1987; 79(5): 1143-1149.
- Hirono I, Shibuya C and Fushimi K. Studies on carcinogenic properties of bracken, *Pteridium aquilinum*. J Natl Cancer Inst. 1970; 45: 179-188.
- Hirono I, Shibuya C, Shimizu M, Fushimi K and Mori H. Carcinogenicity examination of some edible plants. Gann 1972; 63: 383-386.
- Hirono I, Ueno I, Hosaka S, Takanashi H, Matsushima T, Sugimura T and Natori S. Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. Cancer Lett 1981; 13(1): 15-21.
- Hirono I, Yamada K, Niwa H, Shizuri Y, Ojika M, Hosaka S, Yamaji T, Wakamatsu K, Kigoshi H, Niiyama K and Uosaki Y. Separation of carcinogenic fraction of bracken fern. Cancer Lett 1984; 21(3): 239-246.
- Hopkins A. Bracken (*Pteridium aquilinum*): its distribution and animal health implications. Br Vet J 1990; 146(4): 316-326.
- Hurley LH, Lee CS, McGovren JP, Warpehoski MA, Mitchell MA, Kelly RC and Aristoff PA, , 27, . Molecular basis for sequence-specific DNA alkylation by CC-1065. Biochemistry 1988; 27(10): 3886-3892.
- Ishidate MA. Proposed battery of tests for the initial evaluation of the mutagenic potential of medicinal and industrial chemicals. Mutat Res 1988; 205: 397-407.
- Jarrett WF, McNeil PE, Grimshaw WTH, Selman IE and McIntyre WIM. High incidence area of cattle cancer with possible interaction between an environmental carcinogen and a papillomavirus. Nature 1978; 274(215): 217.
- Jones TC and Hunt RD. The urinary system. Veterinary Pathology. 1997. Baltymore, Maryland, Williams and Wilkins: 1111-1147.

Jubb KVF, Kennedy PC and Palmer N. Pathology of domestic animals. 1993. San Diego, Academic Press.

Kamon S and Harayama T. Epidemiology of cancer of the oesophagus in Mye, Nara and Wakayama prefecture with special reference to the role of bracken fern. Proc Jpn Cancer Assoc 1975; 34: 211.

Kawai T, Takanashi H, Nakayama M, Mori H and Hirono I. Effect of storage on carcinogenic activity of bracken fern. Cancer Lett 1981; 12: 29-35.

Knight AP and Walter RG (2003) Plants affecting the blood.

Kushida T, Uesugi M, Sugiura Y, Kigoshi H, Tanaka H, Hirokawa J, Ojika M and Yamada K. DNA damage by ptaquiloside, a potent bracken carcinogen: detection of selective strands breaks and identification of DNA cleavage products. J Am Chem Soc 1994; 116: 479-486.

Lebart L and Morineau A. SPAD. N. Portable System for Data Analyses. 2001. Saint-Mondé, France CISIA.

marino Mdmaymry (2010). Resultados de las encuestas de ganado bovino de mayo 2010. Subdirección general de estadística sgt.

Marrero E, Bulnes C, Sanchez LM, Palenzuela I, Stuart R, Jacobs F and Romero J. Pteridium aquilinum (bracken fern) toxicity in cattle in the humid Chaco of Tarija, Bolivia. Veterinary And Human Toxicology 2001; 43(3): 156-158.

Marrero E, Bulnes C, Sánchez LM, Palenzuela I, Stuart R, Jacobs F and Romero J. Pteridium aquilinum (bracken fern) toxicity in cattle in the humid Chaco of Tarija, Bolivia. Vet Hum Toxicol 2001; 43(3): 156-158.

Maxie MG and Jubb KVF. Pathology of domestic animals. 2007. Edinburgh ; New York, Elsevier Saunders.

McKenzie RA. Bovine enzootic haematuria in Queensland. Aust Vet J 1978; 54(2): 61-64.

- Meglia GE, Johannisson A, Agenas S, Holtenius K and Waller KP. Effects of feeding intensity during the dry period on leukocyte and lymphocyte sub-populations, neutrophil function and health in periparturient dairy cows. *Vet J* 2005; 169(3): 376-384.
- Meglia GE, Johannisson A, Petersson L and Waller KP. Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows. *Acta Vet Scand* 2001; 42(1): 139-150.
- Moura JW, Stocco dos Santos RC, Dagli ML, D'Angelino JL, Birgel EH and Beçak W. Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. *Experientia* 1988; 44(9): 785-788.
- Mugera GM and Nerito P. Tumours of the urinary bladder and liver associated with enzootic haematuria in Kenyan cattle. *Vet Rec* 1968; 83(18): 457-459.
- Muralimanohar B and Balakrishnan V. Haematological studies in the spontaneous cases of enzootic bovine haematuria. *Cheiron*. 1995; 9 ref.
- Murphy WM, Beckwith JB and Farrow GM. Tumors of the kidney, bladder and related urinary structures. *Atlas of tumor pathology*. 1994. Washington, DC, AFIP. Third series: 326.
- Nakabayashi T. Isolation of astragalin and isoquercitrin from bracken, *Pteridium Aquilinum*. *Bull Agric Chem Soc Jap* 1955; 19: 104-109.
- Nakayasu M, Sakamoto H, Terada M, Nagao M and Sugimura T. Mutagenicity of quercetin in Chinese hamster lung cells in culture. *Mutat Res* 1986; 174(1): 79-83.
- Niwa H, Ojika M, Wakamatsu K, Yamada K, Hirono I and Matsushita K. Ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, var. *Tetrahedron Lett* 1983; 24(38): 4117-4120.

- Ojika M, Wakamatsu K, Niwa H and Yamada K. Ptaquiloside, a potent carcinogen isolated from bracken fern var. : structure elucidation based on chemical and spectral evidence, and reactions with amino acids, nucleosides, and nucleotides. *Tetrahedron* 1987; 43(22): 5261-5274.
- Olson C, Pamukcu AM and Brobst DF. Papilloma-like virus from bovine urinary bladder tumors. *Cancer Res* 1965; 25: 840-849.
- Osweiler GD and Ruhr LP. Plants affecting blood coagulation *Current Veterinary Therapy Food Animal*. Howard J. 1986. Philadelphia, WB Saunders: 404-406.
- Pamukcu AM. Epidemiologic studies on urinary bladder tumors in turkish cattle. *Ann N Y Acad Sci* 1963; 108: 938-947.
- Pamukcu AM, Erturk E, Price JM and Bryan GT. Lymphatic leukemia and pulmonary tumors in female swiss mice fed bracken fern (*Pteris aquilina*). *Cancer Res* 1972; 32: 1442-1445.
- Pamukcu AM, Ertürk E, Yalçiner S, Milli U and Bryan GT. Carcinogenic and mutagenic activities of milk from cows fed bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res* 1978; 38(6): 1556-1560.
- Pamukcu AM, Göksoy SK and Price JM. Urinary bladder neoplasms induced by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*) to cows. *Cancer Res* 1967; 27(917): 924.
- Pamukcu AM, Olson C and Goksoy SK. Influence of a papilloma vaccine on chronic bovine enzootic hematuria. *Cancer Res* 1967; 27(11): 2197-2200.
- Pamukcu AM, Olson C and Price JM. Assay of fractions of bovine urine for carcinogenic activity after feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). *Cancer Res* 1966; 26(8): 1745-1753.

- Pamukcu AM and Price JM. Induction of intestinal and urinary bladder cancer in rats by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). J Natl Cancer Inst 1969; 43(1): 275-281.
- Pamukcu AM, Price JM and Bryan GT. Naturally occurring and bracken-fern-induced bovine urinary bladder tumors. Clinical and morphological characteristics. Vet Pathol 1976; 13(2): 110-122.
- Pamukcu AM, Wang CY, Hatcher J and Bryan GT. Carcinogenicity of tannin and tannin-free extracts of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rats. J Natl Cancer Inst 1980; 65(1): 131-136.
- Pamukcu AM, Wattenberg LW, Price JM and Bryan GT. Phenothiazine inhibition of intestinal and urinary bladder tumors induced in rats by bracken fern. Natl Cancer Inst 1971; 47(1): 155-159.
- Pamukcu AM, Yalciner S and Bryan GT. Inhibition of carcinogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) by various chemicals. Cancer 1977; 40: 2450-2454.
- Pamukcu AM, Yalciner S, Hatcher JF and Bryan GT. Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). Cancer Res 1980; 40: 3468-3472.
- Pamukcu AM, Yalciner S, Price JM and Bryan GT. Effects of the coadministration of thiamine on the incidence of urinary bladder carcinomas in rats fed bracken fern. Cancer Res 1970; 30(11): 2671-2674.
- Parker WH and McCrea CT. Bracken (*pteris aquilina*) poisoning of sheep in the north york moors. Vet Rec 1965; 77: 861-865.
- Peixoto PV, Franca Td, Barros CSL, Tokarnia CH and do NF. Histopathological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil. Pesq Vet Bras 2003; 23 (2): 65-81.
- Penberthy J. Vegetable poisoning simulating anthrax in cattle. J Comp Pathol 1893; 6: 266-275.

- Pennie WD and Campo MS. Synergism between bovine papillomavirus type 4 and the flavonoid quercetin in cell transformation in vitro. *Virology* 1992; 190: 861-865.
- Peretti V, Ciotola F, Albarella S, Russo V, Di Meo GP, Iannuzzi L, Roperto F and Barbieri V. Chromosome fragility in cattle with chronic enzootic haematuria. *Mutagenesis* 2007; 22(5): 317-320.
- Perez-Alenza MD, Blanco J, Sardon D, Sanchez Moreira MA and Rodriguez-Bertos A. Clinico-pathological findings in cattle exposed to chronic bracken fern toxicity. *N Z Vet J* 2006; 54(4): 185-192.
- Pinto C, Januario T, Geraldine M, Machado J, Lauren DR, Smith BL, Robinson RC, Acamovic T, Stewart CS and Pennycott TW. Bovine enzootic haematuria on Sao Miguel Island Azores. *Poisonous plants and related toxins*. Acamovic TS, C.S and Pennycott T.W. 2004. Wallingford, CAB International. 47.
- Pinto C, Medeiros F, Freitas F, Cabral A, Oliveira V and Rebimbas F. Neoplasias em bovinos de S. Miguel-Azores. Estudo retrospectivo e situacao actual. *Vet Tecn* 1996; 6: 30-37.
- Pinto C, Peleteiro MC, Lobo MA, Machado J and Silva L. Acute intoxication by bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) in bovines. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias*. 2007; 102: 289-298.
- Pinto CA, Louza AC, Almeida V, Melo M, Vaz Y, Peleteiro MC and Smith BL. Epidemiological characterisation of urinary bladder tumours occurrence in Sao Miguel Island (Azores) dairy cattle population. *Rev Portug Ciencias Vet* 2001; 22 ref.
- Plonait H. Elementos de analisis clinico veterinario. 1980. Zaragoza (España).
- Porter MJ, Field JK, Leung SF, Lo D, Lee JC, Spandidos DA and Van Hasselt CA. The detection of the c-myc and ras oncogenes in nasopharyngeal carcinoma by immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol* 1994; 114: 105-109.



- Prakash AS, Pereira TN, Smith BL, Shaw G and Seawright AA. Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. *Nat Toxins* 1996; 4(5): 221-227.
- Prakash R. Incidence and treatment of enzootic bovine haematuria. *Indian Vet J* 1993; 7
- Prasad MC and George KC. Enzootic bovine haematuria vis-a-vis bracken fern feeding. *Indian Veterinary Journal* 1986; 8 ref.
- Price JM and Pamukcu AM. The induction of neoplasms of the urinary bladder of the cow and the small intestine of the rat by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). *Cancer Res* 1968; 28(11): 2247-2251.
- Radostis OM, Blood DC and Gay CC. *Veterinary Medicine*. 1994. Philadelphia, Elsevier
- Radostits OM and Done SH. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses*. 2007. New York, Elsevier Saunders.
- Reagan WJ, Sanders TG and Denicola DB. *Hematología veterinaria* 1999. Barcelona, Ediciones S.
- Reese R and Richard E. *Un plantamiento práctico en las enfermedades infecciosas*. 2005. Madrid, Diaz de Santos.
- Rosenberger G and Heeschen W. Adlerfarn (*Pteris aquilina*) - die Ursache des sog. Stallrotes der Rinder (*Haematuria vesiclae bovis chronica*). *Dtsch Tierarztl Wschr* 1960; 67(8): 201-208.
- Saito D, Shirai A, Matsushima T, Sugimura T and Hirono I. Test of carcinogenicity of quercetin, a widely distributed mutagen in food. *Teratogen Carcin Mut* 1980; 1(2): 213-221.
- Saito T and Mochizuki D. Isolation of two active glucosides, braxin A1 and A2, from rhizomes of bracken fern. *Toxicol Sci* 1986; 11: 15-27.

- Saito T, Takeno K, Nakamura S and Uehara M. Acute poisoning with braxin A1, a bracken glucoside, in guinea pigs. *Nippon Juigaku Zasshi* 1987; 49: 181-183.
- Sánchez-V A, Arraga de Alvarado C, García D, Pino D, Villarroel R and Boscan J. Observaciones clinico patológicas de vacas con Hematuria Enzootica Bovina. *Rev. Cient. FCV-LUZ*. 2004; XIV((4)).
- Sánchez-Villalobos A, Árraga de Alvarado CM, Villarroel-Neri R, Pino-Ramírez D, García-Bracho D and Sánchez-Cómbita G. Validity, Accuracy and Coefficient of Probability of the Test Urine Reactive Strips and Microscopic Examination of the Urinary Sediment in the Diagnosis of Bovine Enzootic Hematuria. *Rev cienti FCV-LUZ* 2006; XVI( 6): 604-612.
- Sánchez-Villalobos ACM, Árraga de Alvarado CM, Villarroel-Neri R, Pino-Ramírez D, García-Bracho D and Sánchez-Cómbita G. Validez, seguridad y cociente de verosimilitud de los métodos tiras reactivas para orina y examen microscópico del sedimento urinario en el diagnóstico de hematuria enzoótica bovina. *Rev. Cient. FCV-LUZ*. 2006; 16,(6): 604-612.
- Sanchez VA, Villarroel NR, Pino RD, Garcia BD, Molero SG and Carrasco DD. Benchmark of different methods for control of Bovine Enzootic Hematuria. *Rev Cient Fac Ciencias Vet Uni Zulia* 2003; 21
- Sandoval MJ, Sanchez VA, Pino RD, Villarroel NR, Alvarado MM and Garcia BD. Ultrasonographic study of the urinary bladder in bovine enzootic haematuria. *Rev Cient Fac Ciencias Vet Uni Zulia* 2002; 20.
- Sardon D (2006). Hematuria enzoótica bovina natural. Estudio de prevalencia en mataderos. Aspectos histopatológicos, inmunohistoquímicos y moleculares, UCM.
- Sardon D, de la Fuente I, Calonge E, Perez-Alenza MD, Castano M, Dunner S and Pena L. H-ras immunohistochemical expression and molecular analysis of urinary bladder lesions in grazing adult cattle exposed to bracken fern. *J Comp Pathol* 2005; 132(2-3): 195-201.

- Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW and Reuter VE. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *Natl Cancer Inst* 1993; 85: 53-59.
- Schacham P, Philp RB and Gowdey CW. Antihematopoietic and carcinogenic effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rats. *Am J Vet Res* 1970; 31: 191-197.
- Schalm OW and Jain NC. *Schalm's veterinary hematology*. 1986. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Seifi H, Nowrouzian I and Zakarian B. Risk factors associated with bovine urinary bladder tumors in Iran. *Prev Vet Med* 1995; 22: 55-60.
- Shah KV and Howley PM. Papillomaviruses. *Fields virology*. 1996.
- Shahin M, Moore MR, Worrall S, Smith BL, Seawright AA and Prakash AS. H-ras Activation Is an Early Event in the Ptaquiloside-Induced Carcinogenesis: Comparison of Acute and Chronic Toxicity in Rats. *Biochem Bioph Res Co* 1998; 250(2): 491-497.
- Shahin M, Smith BL and Prakash AS. Bracken carcinogens in the human diet. *Mutat Res* 1999; 443(1-2): 69-79.
- Shahin M, Smith BL, Worrall S, Moore MR, Seawright AA and Prakash AS. Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF alpha levels, and mammary gland carcinoma in rats. *Biochem Bioph Res Co* 1998; 244(1): 192-197.
- Shahin M, Smith BL, Worrall S, Moore MR, Seawright AA and Prakash AS. Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF alpha levels, and mammary gland carcinoma in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244(1): 192-197.

- Silva RA, Ramirez L, Souza SS, Ortiz AG, Pereira SR and Davila AM. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. *Vet Parasitol* 1999; 85(1): 87-93.
- Smith BL, Embling PP, Agnew MP, Lauren DR and Holland PT. Carcinogenicity of bracken fern (*Pteridium esculentum*) in New Zealand. *N Z Vet J* 1988; 16
- Smith BL and Seawright AA. Bracken fern (*Pteridium* spp.) carcinogenicity and human health, a brief review. *Nat Tox* 1995; 3(1): 1-5.
- Smith BL, Seawright AA, Ng JC, Hertle AT, Thomson JA and Bostock PD. Concentration of ptaquiloside, a major carcinogen in bracken fern (*Pteridium* spp.), from eastern Australia and from a cultivated worldwide collection held in Sydney, Australia. *Nat Toxins* 1994; 2(6): 347-353.
- Somogyi JC. On antithiamine factors of fern. *J Vitaminol* 1971; 17(3): 165-174.
- Storror DN. Cases of vegetable poisoning in cattle. *J Comp Pathol* 1893; 6: 276-279.
- Sunderman FM. Bracken poisoning in sheep. *Aust Vet J* 1987; 64(1): 25-26.
- Surman C. Bracken fern in New Zealand and its control with asulam. *Bracken: Ecology, Land Use and Control Technology* Smith RT and Taylor YA. 1986. Carnforth, Lancs, Parthenon Press
- Suzuki S, Takada T, Sugawara Y, Muto T and Kominami R. Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. *Cancer Res* 1991; 82(10): 1061-1064.
- Taylor JA. Bracken encroachment rates in Britain. *Soil Use Manage* 1985; 1: 53.

- Tjatur Rasa FS, Saito T and Satoh H. The hemolytic activity of bracken extracts in guinea pigs. *The Journal Of Veterinary Medical Science / The Japanese Society Of Veterinary Science* 1999; 61(2): 129-133.
- Tokarnia CH, Dobereiner J and Peixoto PV. *Plantas toxica do Brasil*. 2000. Rio de Janeiro.
- Valli VE and Parry BW. The hemapoietic system. *Pathology of domestic animals*. Jubb KVF, Kennedy PC and Palmer N. 1993. San Diego, Academic Press. 3: 163-165.
- Van Metre DC. Diseases of the renal system. *Large animal internal medicine*. Bradford PS. 2009. Mosby, St.Louis, Elsevier: 925-971.
- Villalobos-Salazar J. Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia del cancer gastrico en Costa Rica. *Rev Costa Rica Cienc Med* 1985; 6: 131-139.
- Villalobos-Salazar J, Meneses A, Rojas RL, Mora J, Porras RE and Herrero MV (1989). Bracken-derived carcinogens as affecting animal and human health in Costa Rica. Bracken toxicity carcinogenicity as related to animal and human health University College of Wales, International Bracken Group.
- Villalobos-Salazar J, Meneses A and Salas J. Carcinogenic effects in mice of milk from cows fed on bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *AIAS Occasional Publication* 1990; 40(247): 251.
- Wang CY, Chiu CW, Pamukcu AM and Bryan GT. Identification of carcinogenic tannin isolated from bracken fern (*pteridium aquilinum*). *Natl Cancer Inst Monogr* 1976; 56: 33-36.
- Wang CY, Pamukcu AM and Bryang T. Isolation of fumaric acid, succinic acid, astragalin, isoquercitin and tiliroside from *Pteridium Aquilinum*. *Phytochemistry* 1973; 12: 2298-2299.
- Ward JM, Hagiwara A, Tsuda H, Tatematsu M and Ito N. H-ras p21 and peanut lectin immunoreactivity of hyperplastic, preneoplastic and

neoplastic urinary bladder lesions in rats. Jpn J Cancer Res 1988; 79(2): 152-155.

Weiss DJ, Wardrop KJ and Schalm OW. Schalm's veterinary hematology. 2010. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell.

Xu LR. Bracken poisoning and enzootic haematuria in cattle in China. Res Vet Sci 1992; 53(1): 116-121.

Yasuda Y, Kihara H and Nishimura H. Embryotoxic effects of feeding bracken fern (*Pteridium aquilinum*) to pregnant mice. Appl Pharmacol 1974; 28: 264-268.

Yoshida M and Saito T. Non-urotoxic induction of hemorrhagic cystitis by braxin C, a bracken toxin, in guinea pigs. J Toxicol Sci 1994; 19(2): 55-59.

Yoshikawa T, Oyamada T, Yoshikawa H and Sakaguchi M. Histopathogenesis of bracken fern-induced experimental tumor of urinary bladder. Nippon Juigaku Zasshi 1981; 43(6): 875-885.